

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE INVASIF ET INFLAMMATOIRE DES
CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES CD133(+)

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

KARINE PLOUFFE

MAI 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué, de quelques manières que ce soit, à la réalisation de ce projet de maîtrise. Tout d'abord, je voudrais remercier particulièrement mon directeur de recherche, Dr Richard Béliveau, pour sa passion scientifique contagieuse, ses encouragements inestimables ainsi que son expertise scientifique remarquable. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir pris sous votre aile. De plus, je tiens à remercier le Dr Borhane Annabi pour son supra maximum de patience qu'il a témoigné à mon égard. J'aimerais aussi remercier Marie-Paule Lachambre pour son aide considérable dans la réalisation technique de ce projet.

Je tiens également à remercier mes collègues du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et du Laboratoire de Médecine Moléculaire, plus particulièrement Asmaa Sina, Sylvie Lamy, Carl Laflamme et Simon Lord-Dufour, pour leur amitié, leur support, tant technique que moral, ainsi que pour les bons moments passés en leur compagnie. Vous êtes gravés dans ma mémoire...

J'aimerais finalement remercier la Faculté des Sciences de l'université du Québec à Montréal pour l'attribution d'une bourse d'excellence.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGNES ET ACRONYMES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv

CHAPITRE I

INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1. Généralités.....	1
1.1.2. Tumeurs cérébrales.....	1
1.1.3. Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	2
1.1.4. Les modèles du cancer	3
1.2. Les cellules souches cancéreuses.....	4
1.2.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses.....	4
1.2.2. Marqueur de surface des cellules souches cancéreuses : CD133	6
1.2.3. CD133 comme biomarqueur tumoral cérébral	7
1.2.4. La niche vasculaire : localisation préférentielle des cellules souches cancéreuses.....	8
1.3. Invasion tumorale.....	9
1.3.1. Phénotype invasif des cancers cérébraux	9
1.3.2. L'angiogenèse	10
1.3.3. La matrice extracellulaire.....	11
1.3.4. Les métalloprotéinases	11
1.3.5. La famille des récepteurs d'endocytose de type LRP	12
1.4. Inflammation et cancer	13
1.4.1. Impact de l'inflammation sur la progression tumorale.....	13

1.4.2. Molécules clés impliquées dans l'inflammation	14
1.4.3. La voie NF- κ B dans l'inflammation	15
1.5 Hypothèse de la recherche.....	16
1.6 Objectifs de la recherche.....	16
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	29
2.1. Matériel.....	29
2.2. Méthodes.....	30
2.2.1. Culture cellulaire.....	30
2.2.2. Modèle de tumeurs expérimentales intracrâniennes	30
2.2.3. Isolation des cellules CD133 ⁺ par MACS et validation par cytométrie de flux.....	30
2.2.4. Transfection transitoire des cellules U87 et DAOY	31
2.2.5. Traitement des cellules.....	31
2.2.6. Récolte du milieu conditionné et lyse des cellules	32
2.2.7. Dosage des protéines des échantillons selon la méthode microBCA	32
2.2.8. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western.....	33
2.2.9. Immunodétection des protéines	34
2.2.10. Zymographie	34
2.2.11. Essais de migration cellulaire	35
2.2.12. Extraction de l'ARN total des cellules.....	35
2.2.13. Synthèse de l'ADNc et RT-PCR et PCR quantitative	36
2.2.14. Iodation des protéines RAP et α_2 -Macroglobuline: essais de liaisons différentielles	36
2.2.15. Essais d'internalisation et de liaison différentielles	37
2.2.16. Essais de prolifération cellulaire	37
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	38
3.1. Isolation des cellules U87 CD133 ⁺ et DAOY CD133 ⁺	38
3.2. Effets des facteurs de croissance comme inducteurs de la voie de signalisation	

MAP Kinase.....	38
3.3. Essais de migration cellulaire en présence de S1P et de LPA.....	39
3.4. Induction préférentielle de la phosphorylation de Erk par le S1P et le LPA dans les U87 CD133 ⁺	40
3.5. Expression génique des récepteurs spécifiques au S1P et au LPA.....	40
3.6. Implication de MT1-MMP au cours de la migration et de la prolifération cellulaire induites par le S1P et le LPA	40
3.7. Ciblage pharmacologique des voies de signalisation par les catéchines	41
3.7.1. Détermination d'une dose non cytotoxique d'EGCg.....	41
3.7.2. Modulation de la signalisation par les catéchines	42
3.7.3. Modulation de la cyclooxygénase 2 par les catéchines.....	43
3.8. Expression génique différentielle de Cox 2 et des LRPs suite à divers traitements.....	43
3.8.1. Expression génique différentielle de Cox 2 dans les U87, U251 et DAOY parentales et CD133 ⁺	43
3.8.2. Activité différentielle de la MMP-9 par le TNF, le PMA et le CoCl ₂	44
3.8.3. Expression génique des LRPs des cellules U87 parentales et CD133 ⁺ ..	45
3.8.4. Expression génique des LRPs des cellules U251 parentales et CD133 ⁺ ..	45
3.8.5. Expression génique des LRPs des cellules DAOY parentales et CD133 ⁺	46
3.9. Liaison et internalisation de RAP et de l' α_2 -Macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺	47
3.10. Modulation protéique d'I κ B, de Cox 2, de MT1-MMP et de LRP85 par siMT1-MMP dans les DAOY parentales et CD133 ⁺	47
3.11. Modulation de l'activité de MMP-9 par siMT1-MMP dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺	48
3.12. Liaison et internalisation différentielle de RAP et de l' α_2 -Macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺ transfectées avec siMT1-MMP	49
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	81
4.1. Potentiel invasif des CSC en réponse aux facteurs plaquettaires circulants.....	81

4.1.1. Contribution de MT1-MMP à l'axe de signalisation MT1-MMP/S1P des CSC	82
4.1.2. Ciblage pharmacologique des voies de signalisation par les catéchines	82
4.2. Modulation de l'expression de LRP1, de Cox-2 et d'I κ B dans un environnement inflammatoire, carcinogénique et hypoxique	84
4.2.1. Modulation de l'expression des récepteurs LRPs dans le développement	84
4.2.2. Contribution de MT1-MMP dans la régulation de LRP1, de Cox-2 et d'I κ B.....	86
4.3. Utilisation de CD133 comme marqueur exclusif des CSC cérébrales	88
CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	94
Bibliographie	96

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma intégratif des sept signatures phénotypiques du cancer.....	18
1.2 Origine et formation des cellules souches cancéreuse.....	19
1.3 Identification de cellules souches cancéreuses exprimant CD133 à leur surface.....	20
1.4 Diagramme prédictif de la topologie de CD133.....	21
1.5 Schéma simplifié de la composition cellulaire des gliomes.....	22
1.6 Modèle du rôle de la niche vasculaire dans le cancer.....	23
1.7 Représentation schématique du processus d'angiogenèse tumorale.....	24
1.8 Modèle général de l'adhésion cellule-matrice et leur régulation en aval.....	25
1.9 Représentation schématique des différents domaines structuraux des MMPs.....	26
1.10 Représentation schématique du lien fonctionnel entre MT1-MMP et LRP dans les cellules malignes.....	27
1.11 Représentation schématique de l'activation de NF- κ B par le TNF- α	28
3.1 Isolation des cellules U87 CD133 ⁺ et DAOY CD133 ⁺	50
3.2 Stimulation des voies des MAP kinase avec divers facteurs de croissance.....	51
3.3 Optimisation de la migration cellulaire des U87 parentales.....	54
3.4 Essais de migration cellulaire en présence de S1P et de LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	55
3.5 Variation de P-Erk dans le temps suite à la stimulation au S1P et au LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	56
3.6 La signalisation intracellulaire Erk est différenciellement modulée par le S1P et le LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	57
3.7 Expression génique relative des récepteurs respectifs du S1P et du LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	58
3.8 Rôle de MT1-MMP dans la régulation différentielle de la migration cellulaire et de la phosphorylation de Erk induits par le S1P et le LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	59

3.9 Doses-réponses de l'EGCg en présence de S1P et de LPA dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	61
3.10 Structure chimique des catéchines majoritaire du thé vert.....	62
3.11 Stimulation de la signalisation intracellulaire Erk par le S1P et le LPA en présence de diverses catéchines dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	63
3.12 Stimulation de la signalisation intracellulaire Erk par le S1P et le LPA en présence de diverses catéchines dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	64
3.13 Stimulation de la protéine Cox 2 par le LPA en présence de diverses catéchines dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺	66
3.14 Expression génique de Cox 2 dans les cellules U87, U251 et DAOY parentales et CD133 ⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl ₂	67
3.15 Expression de la MMP-9 et expression génique des LRPs dans les cellules U87 parentales et CD133 ⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl ₂	69
3.16 Expression de la MMP-9 et expression génique des LRPs dans les cellules U251 parentales et CD133 ⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl ₂	70
3.17 Expression de la MMP-9 et expression génique des LRPs dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl ₂	71
3.18 Liaison différentielle à RAP et à l' α_2 -macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺	72
3.19 Modulation par siMT1-MMP des protéines IB, Cox 2, MT1-MMP et LRP85 dans les DAOY parentales et CD133 ⁺	73
3.20 Expression de la MMP-9 dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺ transfectées et traitées au TNF, PMA et CoCl ₂	77
3.21 Liaison différentielle à RAP et à l' α_2 -macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133 ⁺ transfectées avec siMT1-MMP.....	78
4.1 Expression de CD133 à la surface cellulaire des DAOY parentales et CD133 ⁺ selon le temps.....	92
4.2 Essai de prolifération dans le temps des cellules CD133 ⁺ et parentales des trois lignées cellulaires	93

LISTE DES TABLEAUX

Figure	Page
4.1 Expression à la hausse de gènes associés au potentiel souche des CSC CD133 ⁺ du cancer du poumon.....	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABC	<i>adenosine triphosphate-binding cassette</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albumine sérique bovine
C	catéchine
CD133	Prominine-1
Cg	catéchine gallate
ConA	concanavaline A
Cox	cyclooxygénase
CSC	cellules souches cancéreuses
DAOY	cellules de médulloblastome humain
DMEM	milieu Eagle modifié par Dulbecco
EC	(-)-épicatéchine
ECg	(-)-épicatéchine gallate
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EGC	(-)-épigallocatechine
EGCg	(-)-épigallocatechine gallate
EGF	facteur de croissance de l'épithélium
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
GBM	glioblastome multiforme
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
IAP	protéine associée aux intégrines
IGF	facteur de croissance analogue à l'insuline
IL	interleukine
JNKs	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LIF f	acteur inhibiteur de leucémie
LPA	acide lysophosphatidique
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-associated protein</i>
MAPKs	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MDR	<i>receptor multidrug resistance</i>
MEC	matrice extracellulaire
Mek	MAPK/ERK kinase
MEM	milieu minimum essentiel de Eagle
MGMT	méthylguanine méthyltransférase
MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire

MT-MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire de type membranaire
NFκB	facteur nucléaire κB
NOS	oxyde nitrique synthase
NSF	facteur de survie neuronale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p38	protéine 38
PBS	tampon bi-phosphate salin
PDGF	facteur plaquettaire de croissance
PGE2	prostaglandine E2
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PVDF	polyvinylidène difluorure
RAP	<i>receptor associated protein</i>
RT-PCR	transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase
S1P	sphingosine-1-phosphate
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	tampon tris salin
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthylènediamine
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
TNF	facteur de nécrose tumorale
tPA	activateur tissulaire du plasminogène
U87	cellules de glioblastome humain
uPA	activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR	récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

LISTE DES SYMBOLES

%	pourcentage
α	alpha
β	beta
γ	gamma
κ	kappa
°C	degré Celsius
min	minute
μ l	microlitre
ml	millilitre
μ M	micromolaire
mM	millimolaire
μ g	microgramme
mg	milligramme
rpm	rotations par minute

RÉSUMÉ

L'OMS estime que d'ici 2030, le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et atteindre 12 millions de personnes annuellement. À ce jour, le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) prend de plus en plus d'ampleur. Les CSC ont été l'objet de plusieurs hypothèses portant sur leurs propriétés de résistance à l'apoptose, à de nombreux médicaments ainsi qu'à l'irradiation. Ce modèle propose qu'une petite sous-population seulement de cellules au sein de la tumeur dispose d'une capacité significative de proliférer et de régénérer une nouvelle tumeur analogue à la tumeur primaire. Vu que le marqueur CD133 (promiline-1) a été identifié comme un des plus puissants marqueurs des CSC et que son expression est hautement significative dans les tumeurs récurrentes, nous avons voulu investiguer le phénotype invasif et inflammatoire associé à ce marqueur dans trois lignées cellulaire triées. La recherche présentée dans ce mémoire s'articule autour de trois axes de recherche principaux. Le premier concerne le potentiel invasif des CSC en réponse à des facteurs plaquettaires circulants, le S1P (sphingosine-1-phosphate) et le LPA (acide lysophosphatidique). Cette étude suggère la contribution de MT1-MMP au cours de la signalisation induite par le S1P. Le deuxième axe de recherche s'intéresse davantage à la modulation de l'expression des LRP (*low density lipoprotein receptor-associated protein*), de Cox-2 et d'I κ B dans un environnement inflammatoire, carcinogénique et hypoxique ; conditions qui miment l'environnement tumoral. Nos données expérimentales suggèrent que les différents traitements peuvent autant moduler l'expression génique des LRP dans les cellules de la masse tumorale qu'affecter le niveau d'activité de liaison de ces récepteurs au sein des CSC CD133⁺. Notre étude nous amène à proposer un modèle global dans lequel LRP apparaît comme un récepteur versatile au niveau de chaque condition engendrée et semble être également moduler dans le développement. Les fonctions de MT1-MMP ont également été investiguées entre autre dans le phénotype inflammatoire des CSC CD133⁺. Les données de notre étude soutiennent la participation des fonctions de MT1-MMP dans l'expression de Cox-2 et cette contribution est impliquée à d'autres niveaux, autre que NF κ B, dans la transcription de Cox-2. Finalement, le dernier volet de notre recherche traite du marqueur CD133, de son expression et de la corrélation entre le phénotype CD133 et la prolifération tumorale. Les difficultés rencontrées dans la détection et dans la purification des cellules CD133⁺ amène un questionnement à ce qui attire à l'utilisation de CD133 comme marqueur exclusif de CSC cérébrales.

L'ensemble de nos recherches vise donc à identifier de nouvelles voies de signalisation et des partenaires moléculaires influençant le phénotype invasif et inflammatoire des CSC. L'identification de MT1-MMP ou des axes MT1-MMP/S1P ou MT1-MMP/Cox-2 sont des cibles thérapeutiques prometteuses dans le traitement du cancer et également des CSC CD133⁺. De plus, cette étude nous permet d'affirmer qu'une investigation plus spécifique de l'expression des LRP au sein de chaque type de cancer doit être effectuée afin de discerner le rôle versatile de ces récepteurs dans la progression tumorale et dans le développement.

Mots clé : cellule souche cancéreuse, CD133, MMP, LRP, Cox-2, invasion, inflammation.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1. Généralités

L'OMS estime que, d'ici 2030, le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et atteindre 12 millions de personnes annuellement. Aujourd'hui, la probabilité d'être atteint d'un cancer au cours de la vie s'établit à environ 45 % chez l'homme et à 40 % chez la femme, soit un homme sur 2,2 et une femme sur 2,5 (Société canadienne du cancer, 2009). Malgré des traitements cliniques à la fine pointe de la technologie incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, ceux-ci sont considérés encore aujourd'hui comme des bénéfices palliatifs pour les patients atteints du cancer. Normalement, le développement, le fonctionnement, la reproduction et la mort d'une cellule saine se font d'une façon bien ordonnée, ce qui nous permet de rester en bonne santé. Toutes les cellules de l'organisme sont soumises à un renouvellement constant et programmé, des cellules meurent par vieillissement ou par dysfonctionnement et sont remplacées, afin que les tissus et les organes conservent leur fonction. Dans certains cas, certaines cellules anormales échappent à ce phénomène de régulation et acquièrent le pouvoir de se multiplier indéfiniment. Ultiment, elles forment une masse appelée tumeur et elles envahissent le tissu ou l'organe dont elles sont issues, altérant ainsi le fonctionnement de celui-ci. Ainsi, le mot « Cancer » est un terme général qui regroupe plus de 200 maladies différentes qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme.

1.1.2. Tumeurs cérébrales

Une tumeur cérébrale est un groupe de cellules anormales à l'intérieur de l'encéphale. Deux types de cellules sont présentes dans l'encéphale : les cellules nerveuses (neurones) et les

cellules gliales. Les cellules nerveuses sont organisées en réseau permettant aux influx nerveux de se propager entre l'encéphale et le reste du corps. Les cellules gliales entourent les cellules nerveuses et permettent le bon fonctionnement du système nerveux central. Il existe plusieurs types de tumeurs cérébrales, mais, chez les adultes, la plupart des tumeurs se forment dans les cellules gliales ; on parle alors de gliomes. Les gliomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes et les plus communes du cerveau. Sur la base de leurs caractéristiques histologiques, l'OMS a classifié les gliomes selon quatre grades. Un grade est attribué à chaque tumeur en fonction des critères suivants : densité cellulaire, atypie nucléaire, mitose, prolifération microvasculaire et nécrose. Basée sur le type cellulaire prédominant, cette classification de référence est la suivante : grade I (astrocytome pilocytaire), grade II (astrocytome diffus), grade III (astrocytome anaplasique) et grade IV (glioblastome multiforme, GBM) (Louis et al., 2007). Cette classification ainsi que la localisation de la tumeur permettent de préciser le type de tumeur et sa gravité. Les deux derniers grades sont considérés comme étant des gliomes de haut grade (gliomes malins) et sont associés à des pronostics défavorables. En effet, une personne atteinte d'un gliome de grade III voit son espérance de vie chuter à quelques années tandis qu'une personne atteinte d'un gliome de grade IV ne pourra survivre qu'entre six et douze mois à la suite du diagnostic (Dell'Albani, 2008). Outre les gliomes, on peut inclure parmi les tumeurs du cerveau les médulloblastomes et les épendymomes (McKinney 2005), qui affectent surtout les enfants, de même que les oligodendrogliomes (Baehring 2005). Les stratégies de traitements des glioblastomes restent encore insatisfaisantes et la plupart sont basées sur une compréhension limitée de la biologie de la maladie. Leur échec s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs, excluant toute exérèse totale, et une relative résistance à la radiothérapie et aux chimiothérapies actuelles.

1.1.3. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Il est bien établi que les tumeurs primaires émergent à la suite de mutations séquentielles ciblant des gènes clés impliqués notamment dans la régulation de la croissance cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Plusieurs altérations essentielles à la plupart des cellules cancéreuses ont été identifiées au cours des nombreuses études relatives au cancer. Les

cellules tumorales manifestent une autosuffisance face aux signaux de croissance c'est-à-dire qu'elles peuvent aller d'un stade quiescent à un stade de prolifération active en absence de signaux de croissance mitogénique. Elles démontrent une insensibilité aux inhibiteurs de croissance. Dans une cellule saine, plusieurs signaux antiprolifératifs agissent afin de maintenir une quiescence cellulaire et l'homéostasie des tissus. Les signaux antiprolifératifs peuvent bloquer la prolifération cellulaire par deux mécanismes distincts. Les cellules peuvent être contraintes à quitter le stade de prolifération active pour le stade de quiescence (G_0). Cet état peut être temporaire, car un événement futur peut permettre, via des signaux extracellulaires, de rediriger cette cellule dans un stade de prolifération active. D'un autre côté, une cellule peut être incitée définitivement à renoncer à son potentiel de prolifération en étant amenée à entrer dans un stade postmitotique, généralement associé à l'acquisition de traits de différenciation. Les cellules cancéreuses sont capables de se soustraire à ces signaux antiprolifératifs ce qui leur permet de croître. En plus de détenir ces particularités, les cellules cancéreuses sont résistantes à l'apoptose. Cette résistance peut être acquise par les cellules cancéreuses au moyen de plusieurs stratégies. Par exemple, les mutations dans le suppresseur tumoral p53 amènent une inactivation fonctionnelle de cette protéine dans plus de 50% des cancers chez l'homme (Harris, 1996). Également, un microenvironnement inflammatoire est une prédisposition à plusieurs types de cancers (Colotta et al., 2009). En effet, ce milieu promeut la progression tumorale par l'infiltration de globules blancs au site de la tumeur, dont des macrophages associés à la tumeur, par la présence de polypeptides messagers de l'inflammation comme les cytokines, les chimiokines ainsi que par des molécules impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'angiogenèse. Finalement, en plus de détenir un potentiel illimité de réplication et une angiogenèse soutenue, ces cellules formant la tumeur ont la capacité d'envahir les tissus par la formation de métastases (Fig 1.1) (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.4. Les modèles du cancer

À ce jour, deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la prolifération des cellules cancéreuses. Dans le modèle classique, dit stochastique, toutes les cellules composant la tumeur détiennent un potentiel oncogénique similaire qui est activé de manière aléatoire et à

faible fréquence. Ce concept, proclamant que chaque cellule d'une tumeur est potentiellement capable de réinduire celle-ci, justifie les approches thérapeutiques visant à éradiquer le maximum de cellules malignes. En contraste, le modèle hiérarchique, dit modèle des cellules souches cancéreuses (CSC), propose qu'une petite sous-population seulement de cellules au sein de la tumeur dispose d'une capacité significative de proliférer et de régénérer une nouvelle tumeur analogue à la tumeur primaire, tandis que les autres cellules tumorales sont en phase terminale de différenciation et vouées à la mort (Reya et al., 2001). Le concept des cellules souches cancéreuses fut abordé pour la première fois dans une étude sur la leucémie. Il fut rapporté qu'une population de cellules néoplasiques démontrait une certaine hétérogénéité en égard à sa prolifération et à sa différenciation (Bonnet et Dick, 1997). Ces cellules souches possèdent une grande capacité à s'autorenouveler et à proliférer ce qui, dans la majorité des cellules leucémiques par exemple, n'est pas observé (Bonnet, 2005). L'analyse de ces cellules souches leucémiques a pu démontrer la nécessité et la suffisance de ces cellules à maintenir la population tumorale (Passegué et al., 2003). Dans le cancer, il y a de plus en plus d'évidence qu'une population cellulaire minoritaire (moins de 1 %), détenant des propriétés des cellules souches, est responsable de la maintenance ainsi que de la croissance de la tumeur (Reya et al., 2001). Les CSC sont donc définies comme les rares cellules de la tumeur qui sont capables d'induire et d'entretenir une prolifération qui reconstitue la tumeur lorsque ces CSC résistent à tout traitement. Par contre, le modèle des CSC n'est pas sans controverses. Plusieurs études apportent des évidences que les cellules cancéreuses non-souches, qui ne détiennent pas les particularités des CSC, peuvent aussi régénérer une tumeur hétérogène *in vivo* (Beier et al., 2007; Pfenninger et al., 2007).

1.2. Les cellules souches cancéreuses

1.2.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches normales dans l'organisme adulte sont responsables de la régénération et de la réparation des tissus endommagés ou âgés. Une caractéristique importante des cellules souches est leur habileté d'autorenouvellement sans la perte de la capacité de prolifération pour chaque division cellulaire. Les cellules souches sont immortelles et plutôt résistantes à l'action des médicaments grâce à l'expression de nombreux transporteurs de type ABC

(Soltysova, Altanero et Altaner, 2005). Elles sont capables de se différencier afin de former un type cellulaire spécifique à un tissu donné suite à l'influence paracrine du microenvironnement (par exemple, l'hypoxie versus la normoxie) (Madri, 2009) et d'autres facteurs (LIF, PDGF, PEDF, EGF, TGF- α , CNTF, etc...) (Oshima et al., 2007; Conover et Notti, 2007; Anderson, 2004). Par exemple, le PDGF promeut la différenciation neuronale tandis que le CNTF promeut la différenciation astrocytaire (Anderson, 2004). Les cellules souches se divisent asymétriquement produisant deux cellules filles dont une sera une nouvelle cellule souche et l'autre une cellule progénitrice, laquelle a la capacité de se différencier et de proliférer, mais sans pourtant s'autorenouveler. Les CSC sont, à plusieurs égards, similaires aux cellules souches saines (Soltysova, Altanero et Altaner, 2005) (Fig. 1.2). En effet, les CSC sont habilitées à (Collins et al., 2005):

- s'autorenouveler
- se différencier de façon aberrante
- initier la tumorigenèse
- proliférer et migrer
- résister à la chimiothérapie et à la radiothérapie
- exprimer des marqueurs typiques des cellules souches
- régénérer une copie phénotypique de la tumeur originelle lorsqu'injectées *in vivo*

Habituellement, les CSC sont relativement quiescentes, ce qui leur permet de ne pas être affectées par les thérapies ciblant les cellules qui se divisent rapidement (Yang et Wechsler-Reya, 2007). À ce jour, il n'est pas encore établi si les CSC proviennent des cellules souches normales à la suite de changements génétiques et/ou par dédifférenciation de cellules somatiques tumorales en cellules souches. Par contre, l'isolement et l'identification de CSC dans les tumeurs humaines et dans des lignées cellulaires tumorales ont été couronnés de succès. Présentement, l'existence des CSC a été prouvée dans la leucémie myéloïde aiguë et chronique (Bonnet et Dick, 1997), dans le cancer du sein (Al-Hajj et al., 2003), les tumeurs cérébrales (Singh et al., 2003), le cancer du pancréas (Esposito et al., 2002) et les tumeurs gastro-intestinales (Altaner, 2008).

En 2003, l'identification et la purification de CSC d'une tumeur cérébrale humaine ont été rapportées (Singh et al., 2003). L'isolation de ces cellules a été réalisée par sélection des cellules exprimant l'antigène de surface CD133 des cellules souches neuronales. Les auteurs ont démontré que l'injection *in vivo* des CSC CD133⁺ dans un modèle de souris expérimental pourrait régénérer une tumeur qui s'apparente phénotypiquement à la tumeur originelle du patient. Ces CSC représentent une fraction minime des cellules constituant la tumeur, et ont été identifiées par l'expression à leur surface de CD133 : la prominine-1. (Fig. 1.3)

1.2.2. Marqueur de surface des cellules souches cancéreuses : CD133

CD133 est une glycoprotéine localisée à la membrane plasmique, pourvue de cinq domaines transmembranaires, originellement découverte dans les cellules souches neuroépithéliales de souris (Weigmann et al., 1997). Dans le système nerveux central des vertébrés, les neurones et les cellules macrogliales dérivent de cette population cellulaire précurseur, les cellules neuroépithéliales de la zone ventriculaire. À partir de cellules souches hématopoïétiques humaines, la prominine-1 a été isolée grâce à l'anticorps AC133, une protéine épitope spécifique à CD133 (Miraglia et al., 1997) (Fig. 1.4). CD133 se localise dans les protrusions de la membrane cytoplasmique où il interagit avec le cholestérol membranaire (Corbeil et al., 2001). En général, CD133 est exprimé dans différents types de cellules souches, hématopoïétiques et neuronales entre autres (Kania et al., 2005), et dans plusieurs cancers dont celui de la prostate (Collins et al., 2005), du colon (O'Brien et al., 2007), du poumon (Eramo et al., 2008), des ovaires (Ferrandina et al., 2007), du pancréas (Hermann et al., 2007) et du cerveau (Singh et al., 2003). Par contre, de récentes études ont démontré que l'expression de CD133 n'est pas restreinte aux CSC, mais est aussi retrouvée dans les cellules tumorales différenciées. Il existe cinq promoteurs alternatifs, dont trois sont régulés partiellement par méthylation, qui entament la transcription d'ARN_m de plusieurs isoformes de la prominine-1. En effet, au moins sept isoformes de CD133 ont été identifiés (Shmelkov et al., 2004). La possibilité qu'une modification posttraductionnelle, comme la glycosylation, soit impliquée dans la reconnaissance de CD133 par l'anticorps AC133 a été émise (Kemper et al., 2010). Malgré les connaissances sur la régulation de la transcription de CD133, sa fonction spécifique reste bien obscure. Dans un premier temps, une analyse devrait être faite sur la capacité des CSC CD133⁺ à former une tumeur analogue à la tumeur originelle en

régulant à la baisse l'expression de CD133 afin de s'assurer de sa nécessité dans la tumorigénicité. Le rôle direct de CD133 dans le maintien du potentiel tumorigène des CSC doit également être mieux défini. (Bidlingmaier, Zhu et Liu, 2008)

1.2.3. CD133 comme biomarqueur tumoral cérébral

Plus récemment, plusieurs études ont identifié CD133 comme un marqueur à la surface des cellules souches de glioblastome et ont démontré que le nombre de ces cellules varie largement, allant de 1 % dans les tumeurs cérébrales de faible grade à 25 % dans les grades élevés de gliomes (Singh et al., 2004). Les cellules CD133⁺ isolées de tumeurs cérébrales humaines démontrent des propriétés des cellules souches *in vitro* (Singh et al., 2003) et sont capables d'initier et de maintenir la progression tumorale *in vivo* (Singh et al., 2004), suggérant fortement que les cellules CD133⁺ pourraient être les cellules initiatrices des tumeurs cérébrales. Les cellules CD133⁺ démontrent également une résistance aux médicaments grâce à l'expression de nombreux transporteurs de type ABC, dont ABCG2, qui exporte les molécules cytotoxiques à l'extérieur de la cellule (Dell'Albani, 2008). Effectivement, ces cellules ont été caractérisées par une résistance intrinsèque aux agents chimiothérapeutiques tels que la témozolomide, la carboplatine, le paclitaxel (taxole) et l'étoposide (VP16) (Liu et al., 2006). Ces cellules détiennent une capacité de réparation de l'ADN accrue qui s'explique par une expression importante du gène *MGMT*, la méthylguanine méthyltransférase, enzyme qui enlève le groupement méthyle de résidus O⁶-méthylguanine mutagènes produits par des agents alkylants. D'ailleurs, les tumeurs cérébrales exprimant un faible niveau de *MGMT* sont plus sensibles à la chimiothérapie basée sur des agents alkylants (Piperi et al., 2010). Une étude a aussi révélé l'expression élevée de gènes suppresseurs de l'apoptose dont les gènes *Bcl-2* et *BCL-XL* ainsi que des gènes inhibiteurs des protéines d'apoptose (*IAPs*). Les gènes de type *IAPs* préviennent l'apoptose, modulent la division cellulaire et la progression du cycle cellulaire en liant et en inhibant les caspases 3, 7 et 9 (Dell'Albani, 2008) (Fig.1.5). Plusieurs études ont permis d'observer un enrichissement de cellules CD133⁺ dans des gliomes récurrents (Liu et al., 2006). L'équipe de Zeppernick a démontré une corrélation négative entre l'expression de CD133 et la survie des patients atteints de gliomes (Zeppernick et al., 2008).

1.2.4. La niche vasculaire : localisation préférentielle des cellules souches cancéreuses

On retrouve une certaine interaction coordonnée entre le système nerveux et le système vasculaire autant dans la phase de développement du cerveau que dans le cerveau adulte. Cette interaction est responsable de la création d'un microenvironnement spécialisé (communément appelé niche) dans lequel les cellules souches neuronales résident, s'autorenouvellent et se différencient (Ward et Lamanna, 2004). Ce microenvironnement définit une zone dans laquelle les cellules souches résident pour une période indéfinie à la suite du développement embryonnaire pour la production de nouvelles cellules du système nerveux. La niche est un site d'ancrage physique pour les cellules souches et les molécules d'adhésion. Ce microenvironnement à proximité de vaisseaux sanguins permet le trafic de facteurs extrinsèques qui contrôlent le nombre des cellules souches, leur prolifération et la détermination de leur avenir afin de maintenir une balance adéquate entre leur autorenouvellement et leur différenciation. Ainsi, la prolifération des cellules souches est dépendante de la signalisation dynamique de la niche. Plusieurs molécules régulatrices ont été découvertes dans le contrôle de l'autorenouvellement des cellules souches soit le FGF2 et Notch1 ainsi que dans la régulation de la différenciation de ces cellules, dont les protéines Noggin et BDNF (Hagg, 2005). Au cours de la progression tumorale des gliomes, il a été établi que les CSC résident également dans un microenvironnement similaire à la niche des cellules souches neuronales (Barami, 2008; Calabrese et al., 2007) (Fig. 1.6).

Plusieurs données viennent appuyer l'hypothèse que la niche vasculaire de la tumeur cérébrale est anormale et contribue directement à la génération de CSC et à la croissance de la tumeur (De Toni et al., 2006; Dick et Lapidot, 2005). Une dérégulation de la balance entre les signaux prolifératifs et apoptotiques dans la niche pourrait entraîner une prolifération incontrôlée des cellules souches et entamer le processus de tumorigenèse (Clarke et Fuller, 2006). D'ailleurs, il a été démontré que les cellules endothéliales interagissent sélectivement avec les CSC, exprimant CD133 et Nestine, en culture en sécrétant des facteurs qui favorisent l'autorenouvellement de ces CSC et non leur différenciation (Calabrese et al., 2007). Ainsi, l'augmentation de cellules endothéliales ou de vaisseaux sanguins dans des tumeurs

cérébrales orthotopiques expérimentales accroît le nombre de cellules cancéreuses CD133⁺/Nestine⁺ et accélère l'initiation ainsi que la croissance de la tumeur.

1.3. Invasion tumorale

1.3.1. Phénotype invasif des cancers cérébraux

L'envahissement seul par des cellules tumorales n'est pas suffisant pour produire des métastases étendues. Le transport de cellules malignes à travers le sang et/ou la lymphe est requis. Les métastases sont impliquées à plus de 90% dans la mort chez les patients cancéreux (Weigelt, Peterse et Veer, 2005). Certains ouvrages indiquent que les CSC possèdent un potentiel d'adhésion, de migration et d'invasion supérieur en comparaison avec leurs descendants différenciés (Yu et Bian, 2009). Folkman et ses collègues ont démontré qu'une tumeur non vascularisée ne peut pas croître au-delà d'un millimètre cube (Gimbrone et al., 1972). À cette taille, la diffusion passive des nutriments et de l'oxygène est ralentie vers la tumeur, ce qui la contraint à entrer dans un stade de dormance. Malheureusement, dans la plupart des cas, la tumeur peut réagir de manière à favoriser un microenvironnement proangiogénique. Une corrélation entre l'angiogenèse et la croissance tumorale ainsi qu'avec le potentiel métastatique a été établie dans plusieurs types de tumeurs (Onguru et al., 2008). L'envahissement tumoral, le développement de métastases et l'angiogenèse tumorale requièrent la participation des métalloprotéases matricielles (MMPs) dont l'expression augmente avec la tumorigenèse. Il est bien établi que l'invasion cellulaire tumorale requiert un remodelage de la matrice extracellulaire grâce aux protéases à sérine ainsi qu'aux MMPs. Une étude a révélé que l'expression de plusieurs molécules associées à la destruction et au remodelage de la matrice extracellulaire, telles que la MMP-2 et la MMP-9, sont régulées à la hausse dans les cellules souches de glioblastomes (Yu et Bian, 2009).

1.3.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est l'un des champs de recherche les plus étudiés afin de comprendre les mécanismes de régulation et de vascularisation des tumeurs. L'angiogenèse, mécanisme

de néovascularisation, prend naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant (Folkman, 1971). Dans un premier temps, des cellules endothéliales sont activées « sprouting », ce qui conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. La migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase de prolifération, puis d'une différenciation en structure capillaire. Dans un deuxième temps (angiogenèse intussusceptive), un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés sont entamés. Finalement, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés (septation). L'angiogenèse est indissociable de la croissance tumorale dans les tumeurs malignes ; la tumeur ne peut dépasser quelques millimètres cubes si elle ne peut induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins susceptibles de lui acheminer l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance. Au cours de ces dernières années, il est devenu clair que l'angiogenèse n'est pas contrôlée par un seul facteur, mais par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par les cellules normales ou tumorales (Milkiewicz et al., 2006). Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent entre autres les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005), les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) (Presta et al., 2005), le facteur de croissance des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance épidermique (EGF) (Geiger et Peeper, 2009), les MMP et leurs inhibiteurs (TIMPs) (Lakka, Gondi et Rao, 2005) ainsi que les lysophospholipides (sphingosine-1-phosphate (S1P) et acide lysophosphatidique (LPA)) (English et al., 2002) (Fig. 1.7). En dehors de facteurs solubles, les intégrines jouent un rôle considérable dans ce processus en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire. Étonnamment, les CSC contribuent à la régulation paracrine de l'endothélium vasculaire. Il a été démontré que les CSC produisent des niveaux plus élevés de VEGF, autant dans des conditions d'hypoxie que de normoxie, et que cette surproduction entraîne une amplification de la migration des cellules endothéliales (Rich et Eyler, 2008)

1.3.3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est constituée d'un enchevêtrement complexe de macromolécules. Dans la composante protéique de la matrice on distingue un premier groupe, composé par le

collagène et l'élastine, essentiellement responsable de la structure de la matrice et un second groupe, moins abondant, constitué par la fibronectine et la laminine. Ce dernier est plutôt impliqué dans l'organisation de sa structure et dans l'adhérence cellule-matrice (Corda, Samuel et Rappaport, 2000). Les intégrines interagissent avec le collagène, la laminine et la fibronectine et sont les molécules d'adhérence les plus impliquées dans l'interaction avec la matrice extracellulaire (Teodorczyk et Martin-Villalba, 2010). Les intégrines sont de véritables récepteurs, leur liaison avec la matrice extracellulaire engendre des signaux cytoplasmiques importants pour l'adhésion cellulaire, la migration, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les principales voies signalétiques activées par les intégrines sont les MAP kinases (Erk), le PI-3K-PKB/AKT, les Rho de la famille des GTPases et NF- κ B (Rüegg, Dormond et Mariotti, 2010) (Fig. 1.8).

1.3.4. Les métalloprotéinases

Les MMPs sont un groupe d'enzymes qui dégradent plusieurs composantes de la matrice extracellulaire, incluant le collagène fibrillaire et non fibrillaire, la fibronectine, la laminine et la membrane protéoglycane (Chintala et al., 1999). La MMP-9 est de loin le membre le plus complexe de la famille des MMPs. Fonctionnellement, MMP-9 est une molécule effectrice, qui agit en tant que catalyseur dans les processus tels que l'angiogenèse, l'immunité, l'inflammation et la progression tumorale. L'étroite régulation de l'activité de la MMP-9 est établie à plusieurs niveaux différents soit par clairance du milieu extracellulaire et par absorption par les cellules (Van den Steen et al., 2002). MMP-2 est la plus abondante des MMP et est constitutivement sécrétée sous forme de proenzyme latente par plusieurs types de cellule, dont les cellules malignes (Nagase et Woessner, 1999). Cette MMP est régulée par un mécanisme sophistiqué dans lequel la proenzyme sous forme latente est convertie, via une activation intermédiaire, en protéase active. L'activation de la proenzyme MMP-2 est initiée par l'enzyme MT1-MMP (Sato et al., 1994). La capture, l'internalisation ainsi que la clairance de MMP-2 et de MMP-9 du milieu extracellulaire, impliquant notamment le récepteur d'endocytose LRP (« low-density lipoprotein receptor-related protein »), permettent la régulation de la concentration extracellulaire de MMPs ainsi que la protéolyse de la matrice extracellulaire (Emonard et al., 2005).

MT1-MMP est quant à lui, le membre le plus commun de la famille des MMP de type membranaire qui contient six membres (MT1-MMP à MT6-MMP) (Fig. 1.9). La contribution de MT1-MMP dans le potentiel invasif des cellules tumorales a été associée à une variété de tumeurs malignes (Seiki, 2003). Outre son rôle dans l'activation de MMP solubles, MT1-MMP est impliqué directement dans la mobilité cellulaire et dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Hotary et al., 2003). Il a été rapporté que LRP est aussi une cible de MT1-MMP au niveau de la régulation de la protéolyse dans les cellules cancéreuses (Rozanov et al., 2004). MT1-MMP joue un double rôle dans la régulation de l'activité protéolytique associée à la dégradation de la matrice, soit en exerçant une activité fonctionnelle au niveau de la MMP-2 puis en clivant LRP afin de protéger l'enzyme active MMP-2 de l'absorption et de la clairance (Fig. 1.10). Cette double contribution amène un maintien élevé des protéinases solubles telle que la MMP-2 dans le milieu extracellulaire et permet une dégradation extensive de la matrice par les cellules agressives en migration. En plus de MT1-MMP, trois autres membres de la famille des MMPs de type membranaire dont MT2-MMP, MT3-MMP et MT4-MMP sont reconnus efficaces dans le clivage de LRP *in vitro* (Rozanov et al., 2004).

1.3.5. La famille des récepteurs d'endocytose de type LRP

La famille des LRP est constituée d'au moins huit membres dont LRP1 (CD91), LRP1b, LRP2 (megaline), LRP5, LRP8 (récepteur 2 apoE), LDL-R et vLDL-R qui contiennent plusieurs structures homologues. En effet, tous les membres de cette famille de récepteurs contiennent au moins deux domaines riches en cystéines qui sont communément référés à la région liant le ligand (Lillis et al., 2008). Par contre, chacun dénote des fonctions uniques comme le nombre de sites de liaison aux ligands et le nombre de répétitions EGF suggérant des discordances au niveau de leur spécificité de liaison et de leurs fonctions. Tous les membres de cette famille sont reconnus comme étant des récepteurs à la surface cellulaire qui, à la suite de la liaison avec leur ligand, internalisent et dégradent celui-ci via les lysosomes (Lillis et al., 2008). En plus d'exercer une régulation de plusieurs molécules, les LRPs participent dans certains processus cellulaires et physiologiques tels que la migration et la prolifération cellulaire ainsi que la régulation de la perméabilité vasculaire. Aujourd'hui,

trente ligands spécifiques, dont les lipoprotéines, les protéases, l'alpha-2 macroglobuline, les protéines matricielles et des facteurs de croissance, sont connus pour interagir avec les LRPs. Ainsi, les fonctions des LRPs dans l'endocytose des MMP, de l'uPA (activateur plasminogène de type urokinase) et dans l'inhibition de l'effet mitogène de facteurs de croissance semblent leur conférer des propriétés antitumorales. Une faible expression de LRP-1 est en effet le plus souvent corrélée au potentiel invasif des cellules cancéreuses. Cette corrélation a été rapportée pour de nombreux types de cancers dont celui de la prostate, du sein, de la thyroïde, les mélanomes et les gliomes (Langlois et al., 2009). L'interaction entre le ligand et les LRPs est antagonisée par un récepteur associé, la glycoprotéine RAP. De par son habileté à antagoniser la liaison entre le LRP et son ligand, RAP exogène a été utilisé dans plusieurs études afin d'analyser les processus médiés par les différents LRP (Lillis, Mikhailenko et Strickland, 2005).

1.4. Inflammation et cancer

1.4.1. Impact de l'inflammation sur la progression tumorale

Des évidences cliniques et épidémiologiques suggèrent qu'un lien causal existe entre l'inflammation chronique et le cancer. L'infection ou d'autres types d'inflammation chronique sont associés à plus de 25 % de tous les cancers (Schetter, Heegaard et Harris, 2010). Plusieurs recherches démontrent, de plus, que l'inhibition de l'inflammation chronique chez des patients atteints de maladies prémaligènes, ou qui sont prédisposés au cancer, réduit les risques et les récives associés à celui-ci (Thun, Henley et Patrono, 2002). Une réponse inflammatoire aiguë est, en général, bénéfique surtout en réponse à une infection microbactérienne ou dans le cas d'un tissu lésé. Une régulation efficace de la réponse inflammatoire peut ainsi être envisagée comme un processus antitumorigène. Par contre, l'inflammation chronique est néfaste, car elle entraîne plusieurs effets délétères qui prédisposent fréquemment les cellules à une transformation oncogénique. Plusieurs mécanismes peuvent amener l'inflammation chronique à être oncogénique. Une surproduction des espèces réactives oxygénées et azotées (RONS), une expression aberrante de cytokines et de chimiokines inflammatoires, une augmentation de l'expression de la cyclooxygénase 2 et du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) sont seulement quelques

exemples de facteurs moléculaires qui contribuent au développement du cancer par l'inflammation (Schetter, Heegaard et Harris, 2010).

1.4.2. Molécules clés impliquées dans l'inflammation

L'enzyme cyclooxygénase existe sous trois isoformes dont Cox-1, Cox-2 et Cox-3. Cox-1 est constitutivement exprimée dans plusieurs cellules et tissus, et son expression reste constante dans la plupart des conditions physiologiques et pathologiques (Smith, Gararto et Dewitt, 1996). Elle contribue au maintien de la mucosité gastrique, à la régulation du flux sanguin rénal et à la régulation de l'agrégation plaquettaire (Smith et Dewitt, 1995). À l'opposé, Cox-2 est un gène impliqué dans la réponse précoce de l'inflammation. Cox-2 est induite principalement aux sites de l'inflammation en réponse aux stimuli inflammatoires incluant les cytokines pro-inflammatoires comme $IL-1\alpha/\beta$, $IFN-\gamma$ et $TNF-\alpha$ produites par les cellules inflammatoires. Ainsi, Cox-2 est impliqué dans la progression, l'invasion et l'angiogenèse de plusieurs néoplasies incluant certaines tumeurs gliales (Onguru et al., 2008). Cox-3 est une variante de Cox-1 dont l'épissage alternatif diffère et sa fonction reste inconnue (Wang et Dubois, 2008). La cyclooxygénase, aussi connue sous le nom de PG synthase, est l'enzyme clé dans la synthèse des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes à partir de l'acide arachidonique (Dewitt, 1991). Cox convertit l'acide arachidonique relargué par les phospholipases de la membrane phospholipidique en prostaglandine H_2 , le précurseur commun de tous les prostanoïdes (Huang et al., 2003). Il a été démontré que Cox-2 est régulé à la hausse dans plusieurs cancers dont celui du colon, du sein, de la prostate, de la peau (Rüegg, Dormond et Mariotti, 2010) et dans la majorité des gliomes de grades élevés (Joki et al., 2000). Shono et ses collègues ont démontré qu'une expression élevée de Cox-2 est associée à des gliomes cliniques plus agressifs et entraîne un pronostic défavorable (Shono et al., 2001). D'ailleurs, une étude similaire a révélé que les patients atteints d'un glioblastome exprimant fortement la Cox-2 ont une espérance de vie de 10 mois en comparaison à une expression négative de Cox-2 où l'espérance de vie est de 21 mois (Buccoliero et al., 2006). L'induction de l'expression de Cox-2 requiert la synthèse *de novo* de l'ARNm, indiquant une régulation au niveau de la transcription. La région promotrice du gène *Cox-2* humain a été cloné et séquencé, et démontre des séquences de reconnaissance pour une variété de facteurs transcriptionnels dont $NF\kappa B$, $NF-IL-6$ et l'AMPc (Huang et al., 2003). De ceux-ci, $NF-\kappa B$ est

un coordonnateur clé dans l'immunité innée et dans l'inflammation, et il est reconnu comme étant un important promoteur endogène tumoral.

1.4.3. La voie NF- κ B dans l'inflammation

Plusieurs études suggèrent que le facteur de nécrose tumoral (TNF- α) est le médiateur entre l'inflammation et le cancer (Dolcet et al., 2005; Sethi, Sung et Aggarwal, 2008; Balkwill, 2009). La production constitutive de TNF- α par le microenvironnement tumoral est une caractéristique de plusieurs tumeurs malignes et cette surproduction est souvent associée à des pronostiques défavorables (Wu et Zhou, 2010). Vu que les récepteurs du TNF- α (TNFR1 et TNFR2) sont exprimés autant dans les cellules épithéliales que dans les cellules stromales, le TNF- α peut directement faciliter le développement du cancer en régulant la prolifération et la survie des cellules néoplasiques, mais aussi, il peut exercer des effets indirectement sur les cellules endothéliales et sur d'autres cellules inflammatoires présentes dans le microenvironnement tumoral. Les effets pro-inflammatoires du TNF- α s'expliquent par son habileté à activer NF- κ B (Fig. 1.11), tandis que ces effets antitumoraux sont définis par sa capacité à activer la Caspase 3 et à induire l'apoptose. Dans la plupart des types de cellules, lorsqu'exposés au TNF- α , NF- κ B est activé et il entraîne l'expression d'une variété de gènes impliqués dans l'inflammation. Une activation soutenue de NF- κ B a été associée à plusieurs aspects de l'oncogenèse, notamment dans la prolifération cellulaire cancéreuse, dans la prévention de l'apoptose lors de la résistance aux médicaments et dans l'augmentation de l'angiogenèse tumorale et des métastases (Wu et Zhou, 2010). Les rares détections d'altérations génétiques des gènes codants pour les sous-unités de NF- κ B dans les cancers humains ont amené l'évaluation d'autres gènes impliqués dans l'activation de NF- κ B. Un régulateur clé de l'activation de NF- κ B est la famille des protéines I κ B (inhibiteur de kappa B) (Dolcet et al., 2005). Le facteur de transcription NF- κ B est normalement séquestré dans le cytosol par la protéine I κ B. La phosphorylation de I κ B libère NF- κ B qui, activé, est transloqué dans le noyau, tandis que I κ B phosphorylé subira l'ubiquitinylation pour être dégradé par un complexe protéasique, le protéasome (Bowie et O'Neill, 2000). Des altérations dans ces gènes peuvent affecter l'habileté de I κ B à inhiber NF- κ B, ce qui entraîne une activation constitutive de NF- κ B (Cabannes et al., 1999).

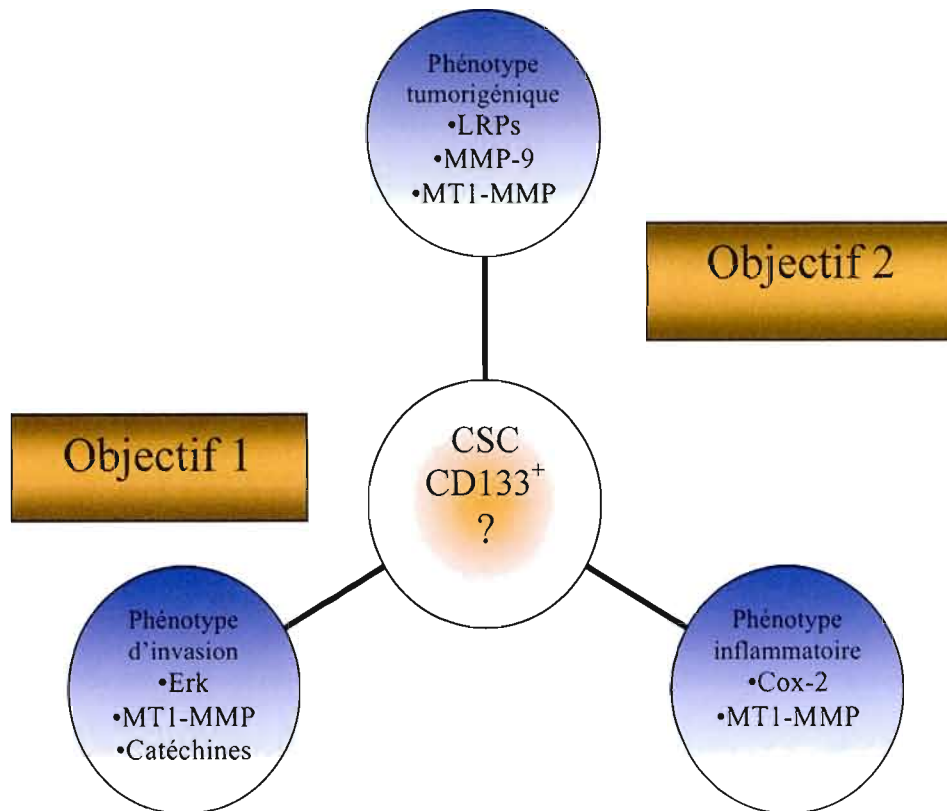
1.5 Hypothèse de la recherche

Hypothèse : Les cellules souches cancéreuses CD133+ sont impliquées dans la résistance aux traitements et dans la récurrence des tumeurs cérébrales. Nous émettons l'hypothèse que l'identification et la caractérisation de nouveaux marqueurs moléculaires permettraient d'améliorer les approches thérapeutiques futures.

1.6 Objectifs de la recherche

Objectif 1 : L'implication des MMP est clairement établie dans l'angiogenèse, l'invasion et la prolifération des cellules tumorales. Outre son rôle bien établi dans l'activation de la proMMP-2 et de son activité intrinsèque de protéolyse des molécules de la matrice extracellulaire, le rôle de MT1-MMP reste méconnu dans le potentiel d'invasion des CSC. Une analyse a donc été portée sur l'implication de MT1-MMP dans le phénotype invasif associé aux CSC CD133⁺. La première partie de notre étude, a eu pour but de comparer les effets différentiels sur la migration ainsi que sur la phosphorylation de Erk dans les CSC CD133⁺ par des facteurs plaquettaires circulants, le S1P et le LPA. D'autre part, la caractérisation des effets antitumoraux des polyphénols sur les CSC CD133⁺ a également été effectuée.

Objectif 2 : La seconde partie de ce mémoire a eu pour but d'évaluer les niveaux d'expression protéique et/ou génique de molécules reconnues dans la progression tumorale incluant Cox-2, la MMP-9 et les LRP6 dans un environnement carcinogénique, hypoxique et inflammatoire, conditions qui miment le microenvironnement tumorale. La contribution de MT1-MMP au phénotype inflammatoire associé aux CSC CD133⁺ a aussi été investiguée. Les résultats exposés dans ce mémoire permettront de mieux comprendre le phénotype invasif et inflammatoire associé au marqueur de surface CD133 afin d'améliorer les traitements existants pour les CSC cérébrales.



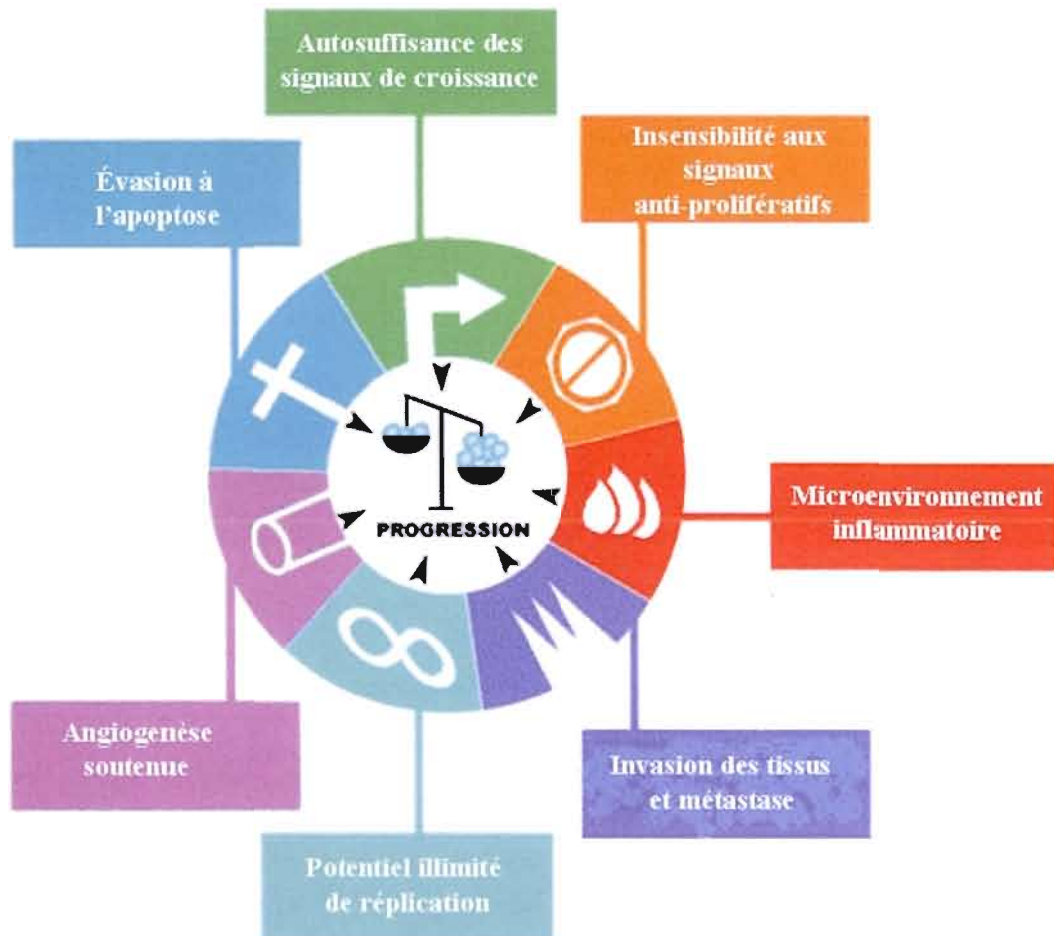


Figure 1.1: Schéma intégratif des sept signatures phénotypiques du cancer.

Altérations essentielles dans la physiologie cellulaire qui, collectivement, dictent la croissance tumorale : autosuffisance des signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, évasion à l'apoptose, potentiel illimité de réplication, angiogenèse soutenue, invasion des tissus et métastase (Hanahan et Weinberg, 2000), et microenvironnement inflammatoire (Colotta et al., 2009).

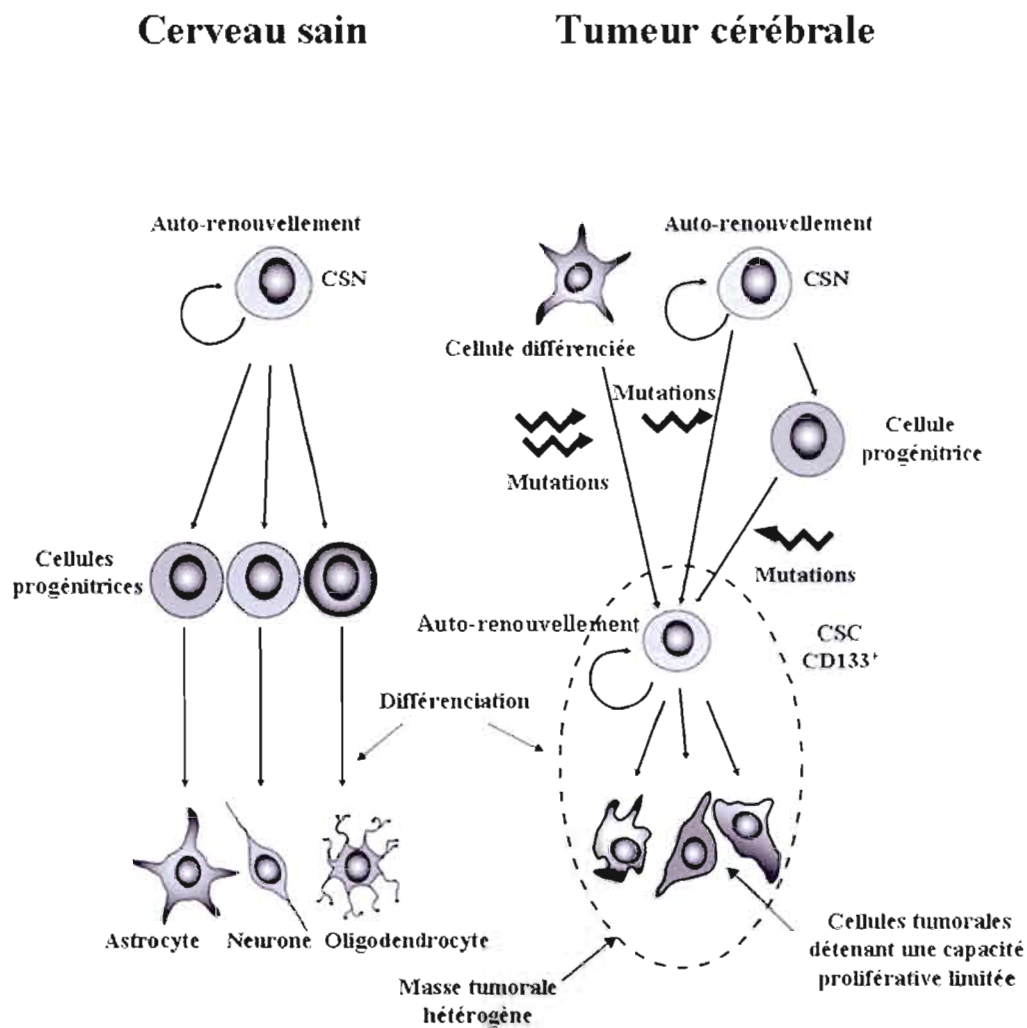


Figure 1.2: Origine et formation des cellules souches cancéreuses.

À gauche, les cellules souches neuronales du cerveau subissent des divisions afin d'engendrer à nouveau des cellules souches, mais aussi des cellules progénitrices qui pourront se différencier dans le but de former les trois principales lignées neuronales soient les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes. À droite, des événements mutationnels multiples ciblent les cellules souches, les cellules progénitrices et les cellules matures du cerveau, ce qui résulte en la formation de cellules souches cancéreuses cérébrales (BTSC). Ces cellules détiennent la capacité de s'autorenouveler, de proliférer et enfin de se différencier de manière aberrante en d'autres cellules composant la tumeur, lesquelles ont une habileté limitée de proliférer. (Singh et al., 2004)

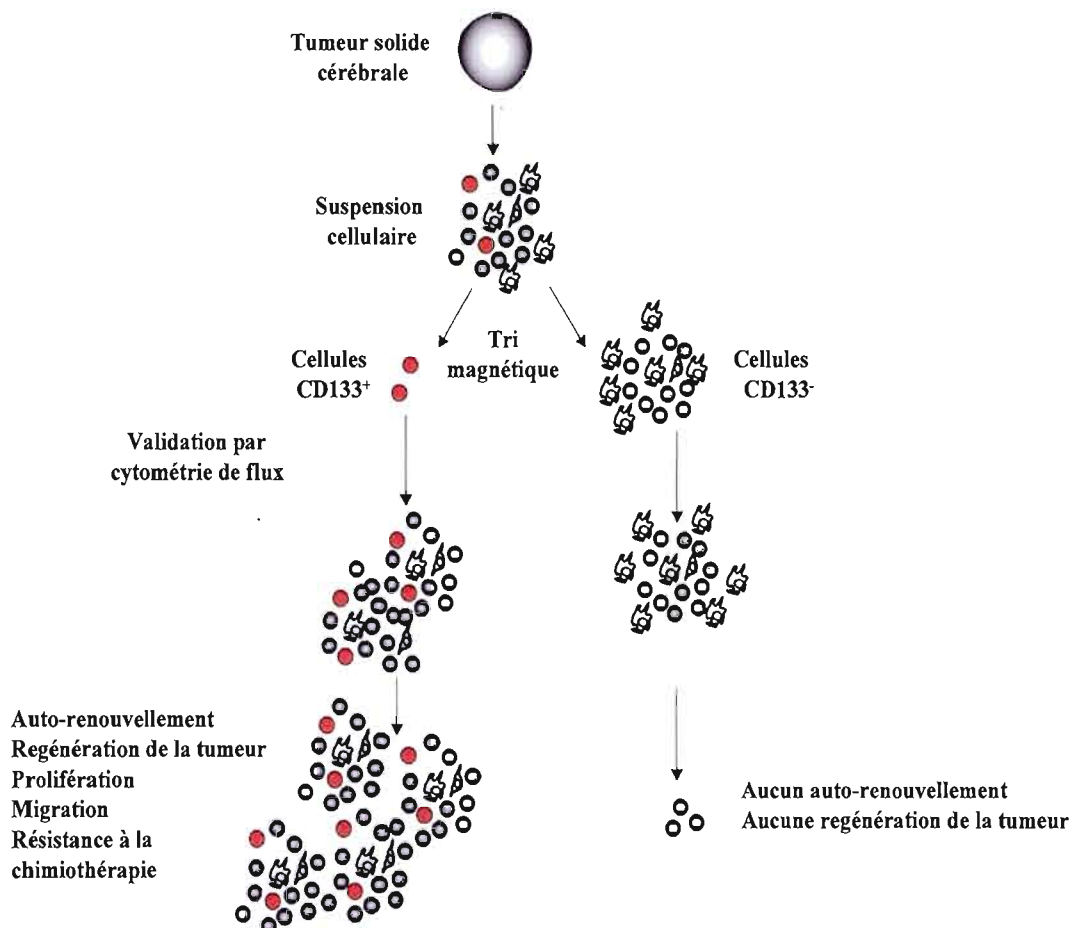


Figure 1.3 : Identification de cellules souches cancéreuses exprimant CD133 à leur surface.

Les CSC, provenant d'une tumeur solide humaine cérébrale, sont identifiées grâce à l'expression du marqueur de surface CD133. L'isolation est exécutée par tri magnétique et la positivité en CD133 de la sous-population isolée est validée par cytométrie de flux seule. La sous-population de cellules exprimant CD133 à leur surface est capable de propager la tumeur dans les essais de tumorigénèse. Les cellules CD133⁻ ne peuvent pas accroître la population tumorale à cause de leur inhabileté à s'autorenouveler. (Modifiée de Singh et al., 2004)

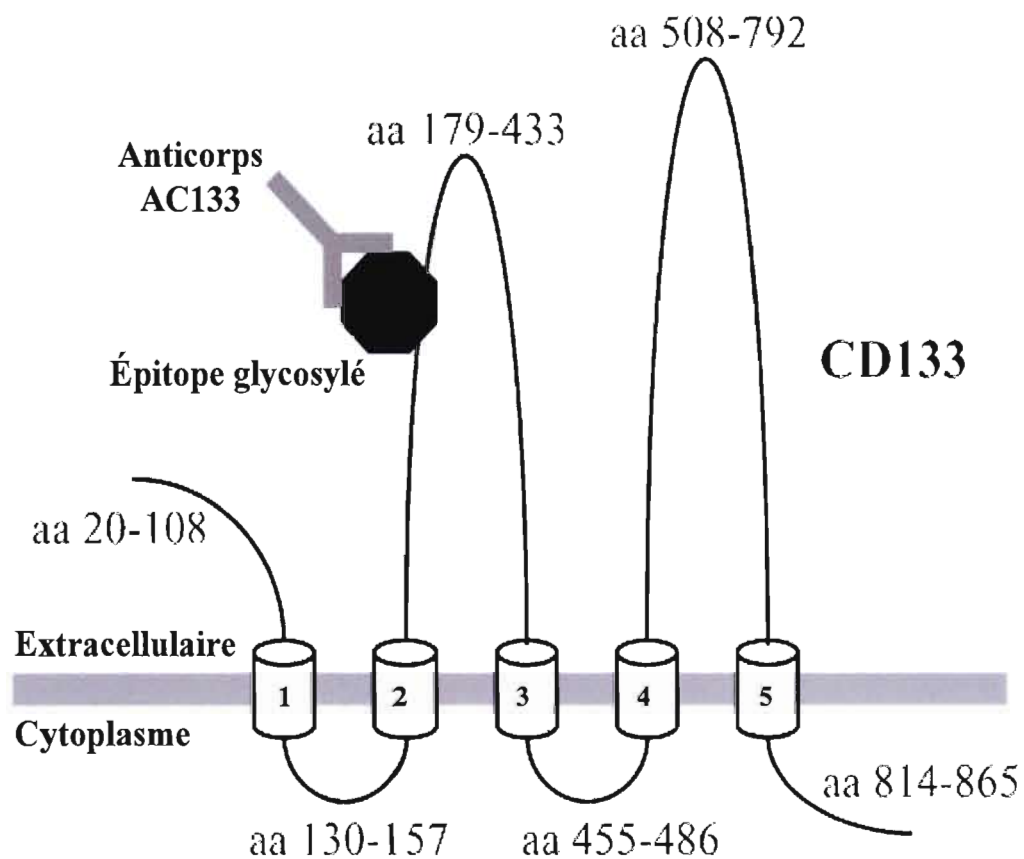


Figure 1.4 : Diagramme prédictif de la topologie de CD133

La prominine-1 (CD133) est une glycoprotéine membranaire pourvue de cinq domaines transmembranaires, indiqués ici par des cylindres. Sa structure se compose de deux larges boucles extracellulaires glycosylées, d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'un domaine C-terminal cytoplasmique. La liaison de l'anticorps AC133 à un site de glycosylation de la région extracellulaire de CD133 est démontrée, mais la localisation de ce site est hypothétique. (Bidlemaier, Zhu et Liu, 2008)

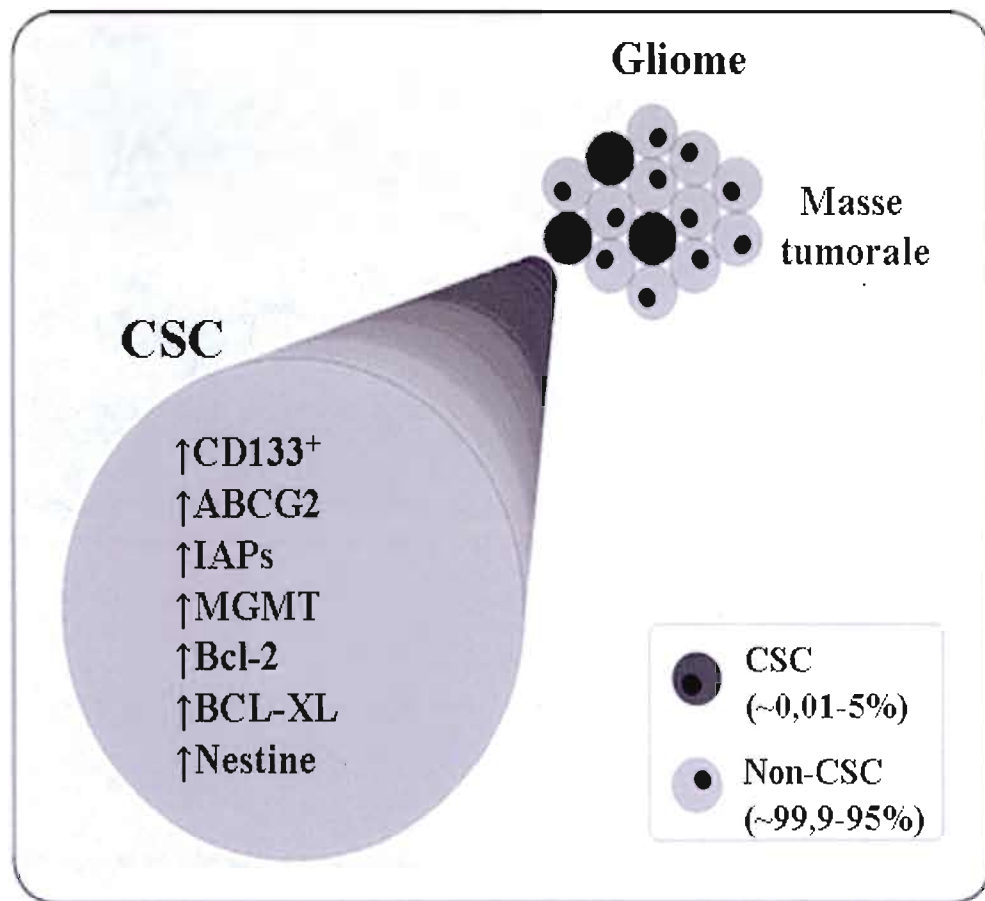


Figure 1.5: Schéma simplifié de la composition cellulaire des gliomes.

Essentiellement, deux populations cellulaires peuvent être observées dans les gliomes : les CSC, une petite population cellulaire d'environ 0,01 à 5 % qui est responsable de l'initiation et de la persistance du cancer et, une population de cellules différenciées (NON-CSC) d'environ 99,9 à 95 % qui représente la masse tumorale. Les CSC démontrent une régulation à la hausse des niveaux de CD133, ABCG2, IAPs, MGMT, Bcl-2, BCL-XL et Nestine qui sont impliqués dans plusieurs mécanismes voués à l'invasion des tissus voisins et à l'évasion des signaux apoptotiques. (Dell'Albani, 2008)

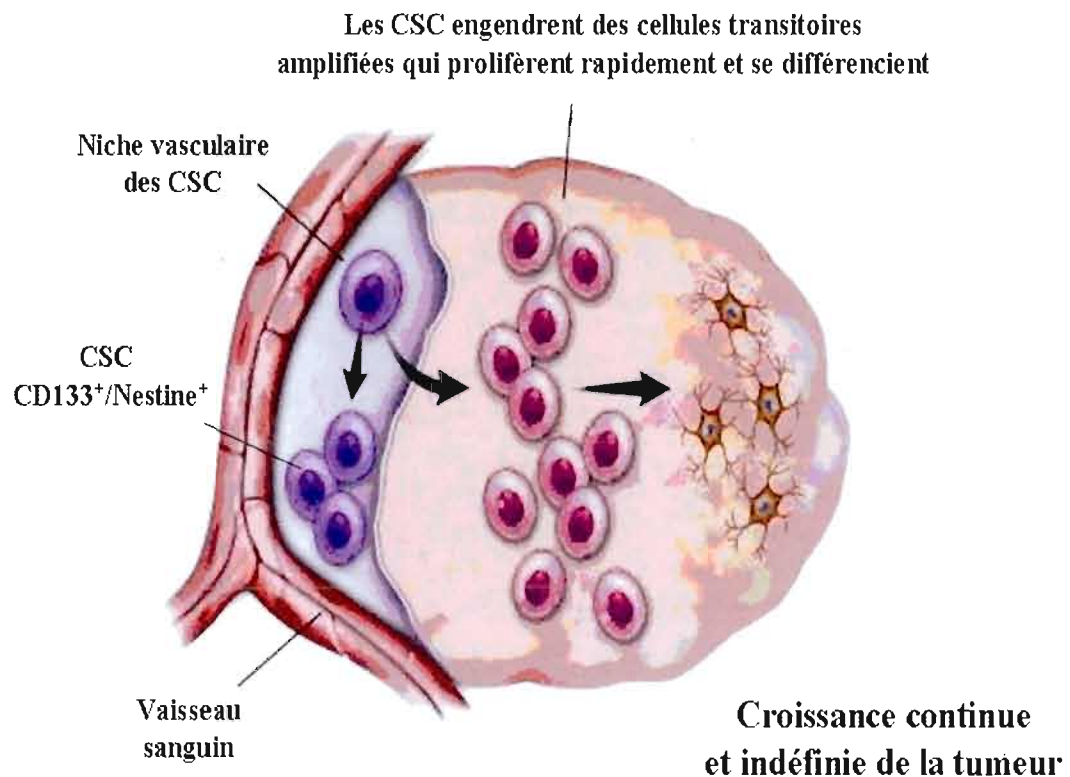


Figure 1.6: Modèle du rôle de la niche vasculaire dans le cancer.

Les cellules souches cancéreuses résident dans un microenvironnement à proximité de vaisseaux sanguins, où elles reçoivent des signaux afin d'engendrer des cellules transitoires amplifiées. Ces cellules transitoires prolifèrent rapidement et constituent l'essentiel de la tumeur en augmentant la proportion de cellules différenciées, mais elles ne peuvent pas s'autorenouveler. Cette génération en continu de cellules transitoires à partir des cellules souches cancéreuses permet à la tumeur de poursuivre son accroissement. (Yang et Wechsler-Reya, 2007)

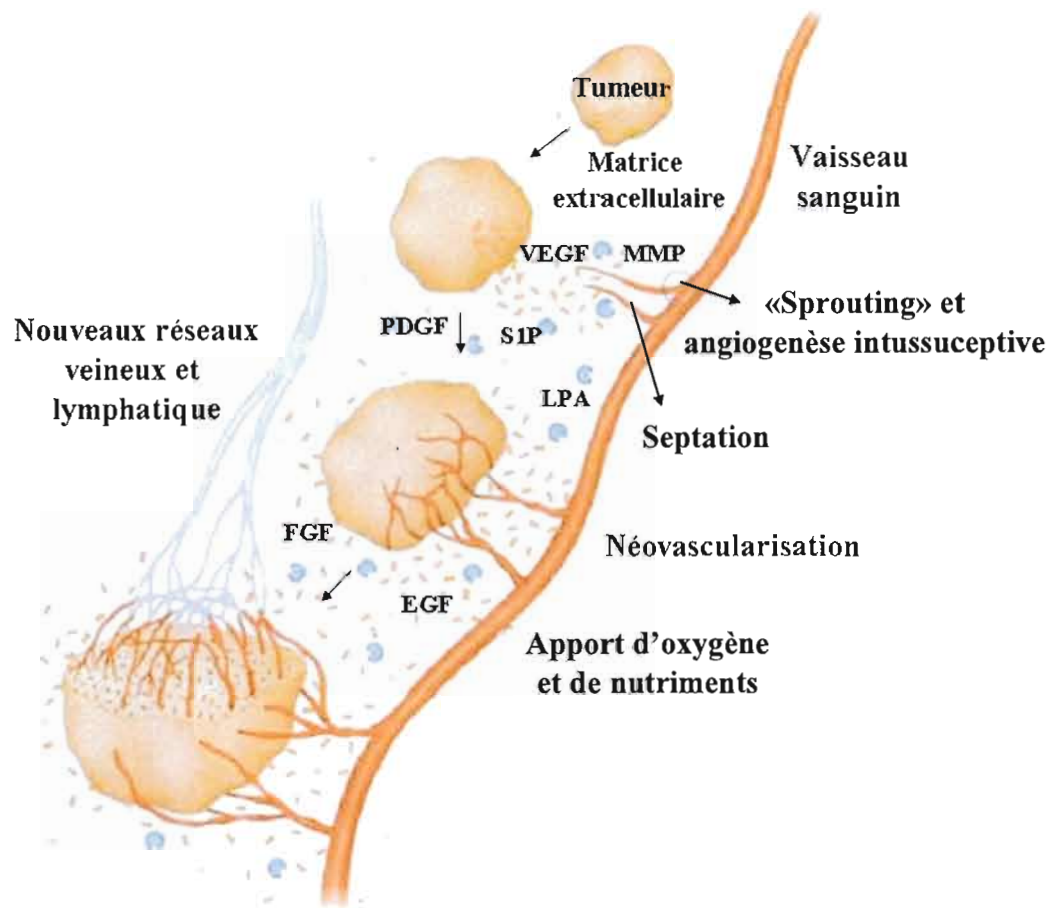


Figure 1.7 : Représentation schématique du processus d'angiogenèse tumorale

Lorsque le volume d'une tumeur dépasse le seuil critique de quelques millimètres cubes, le manque d'oxygène et de nutriments dans les cellules rompt un équilibre. Des cellules endothéliales sont activées, ce qui conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés sont entamés. Ce sont les phases de « sprouting » et de l'angiogenèse intussusceptive. Les cellules endothéliales vont pousser à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés (septation). Les cellules tumorales ou normales sécrètent des facteurs qui stimuleront l'angiogenèse dont le VEGF, FGF, EGF, PDGF, S1P, LPA et MMP. Les nouveaux réseaux veineux et lymphatique évacuent les déchets, mais aussi les cellules cancéreuses qui peuvent former ailleurs des métastases. (Modifié de Glioblastome Association Michèle Esnault, 2009).

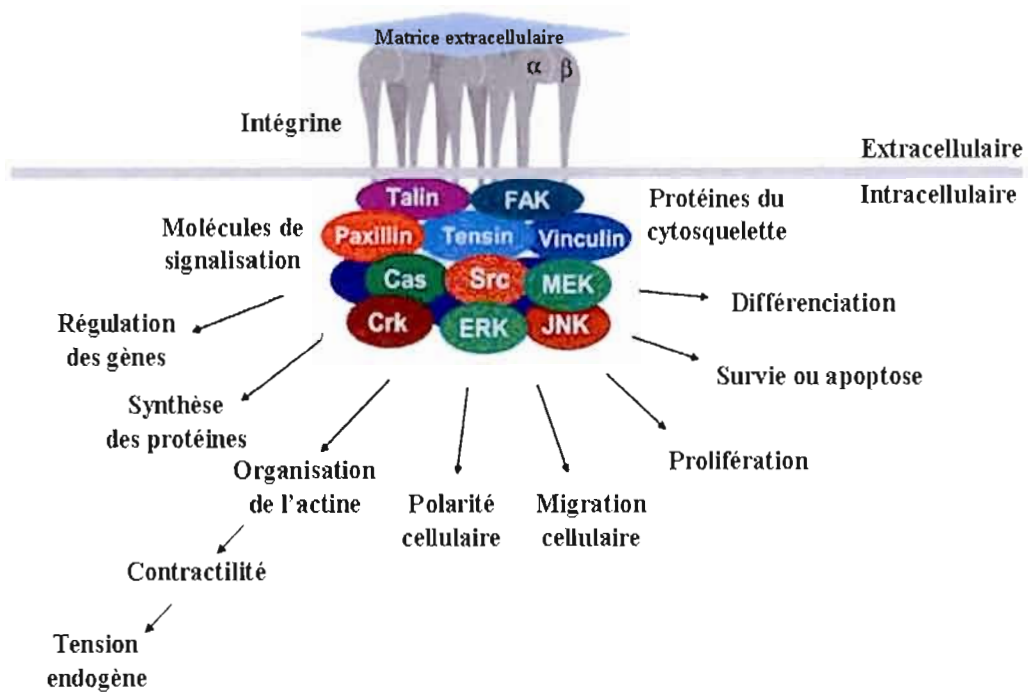


Figure 1.8 : Modèle général de l'adhésion cellule-matrice et leur régulation en aval.

L'adhésion entre la matrice extracellulaire et la cellule est réalisée grâce à la présence des intégrines. Le recrutement de protéines cytoplasmiques s'entame à la membrane, en coopération avec d'autres récepteurs de la surface cellulaire, afin de contrôler diverses fonctions, phénotypes et processus cellulaires. (Berrier et Yamada, 2007)

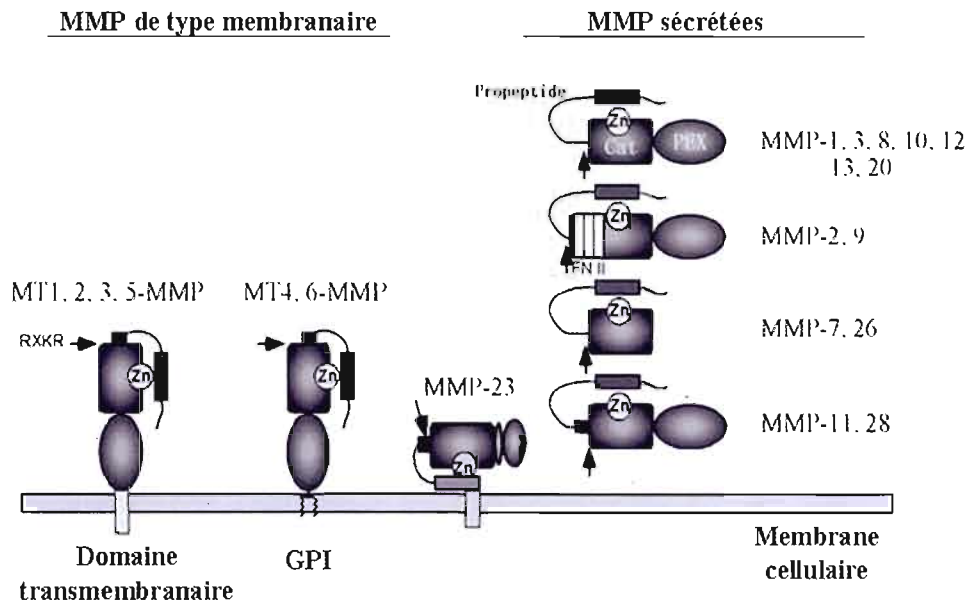


Figure 1.9 : Représentation schématique des différents domaines structuraux des MMPs

Les MMPs sont constituées d'au moins trois domaines structuraux distincts : un propeptide, qui permet de garder la proenzyme sous forme latente et dont le clivage est requis pour l'activation de l'enzyme ; un domaine catalytique, qui renferme le site actif responsable de l'activité protéolytique des MMPs et un domaine hémopepxine, qui est impliqué dans la liaison des substrats et des inhibiteurs. Plusieurs séquences propeptidiques contiennent un motif RXKR qui est un site de clivage pour les protéines convertases. Le domaine catalytique contient un ion de zinc qui permet de procéder à la réaction protéolytique. MMP-2 et MMP-9 ont des domaines de types fibronectine (fn II) et collagène impliqués dans la reconnaissance des substrats. Les MT-MMPs détiennent un domaine transmembranaire ou une ancre de type GPI permettant de les maintenir à la membrane cellulaire. MMP-23 est un intermédiaire ; il a un domaine transmembranaire, un domaine de type immunoglobuline ainsi qu'un domaine hémopepxine. (Seiki, 2003)

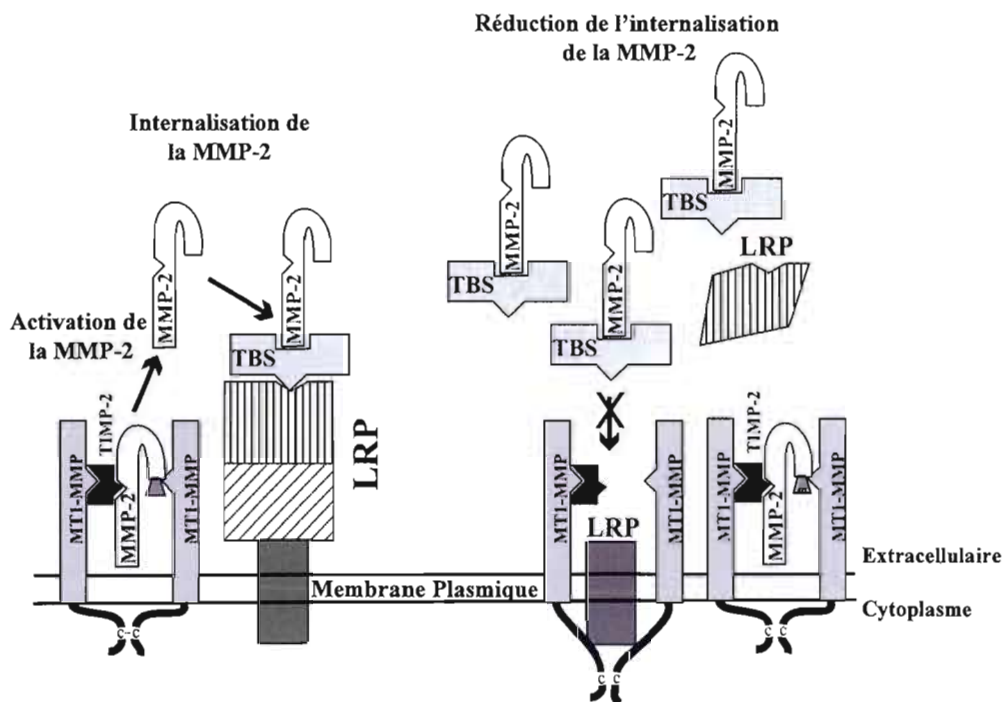


Figure 1.10: Représentation schématique du lien fonctionnel entre MT1-MMP et LRP dans les cellules malignes.

Le complexe MT1-MMP-TIMP-2 s'associe à la proenzyme sous forme latente proMMP-2. Par la suite, un second MT1-MMP libre de TIMP-2 clive la portion N-terminale de MMP-2. L'enzyme MMP-2 activée est transportée dans le milieu extracellulaire. MMP-2 se lie à la thrombospondine (TBS) et est internalisée via son association avec LRP. Les cellules cancéreuses surexpriment MT1-MMP et MMP-2 ce qui permet à MT1-MMP de cliver le LRP cellulaire et de relarguer la portion N-terminale soluble de l'ectodomaine dans le milieu extracellulaire. Ces événements inactivent la fonction de liaison de LRP dans les cellules malignes et permettent de supprimer la clairance de MMP-2 et d'autres ligands du LRP du milieu extracellulaire. (Rozanov et al., 2004)

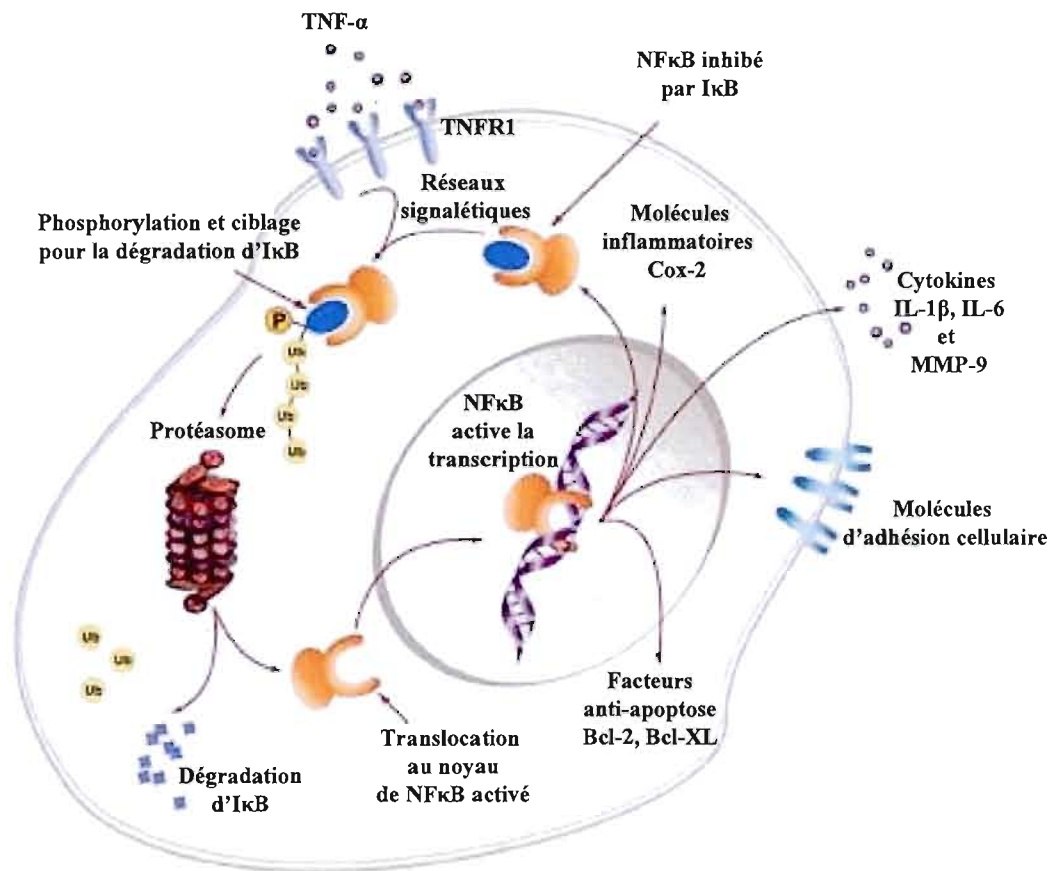


Figure 1.11 : Représentation schématique de l'activation de NF-κB par le TNF-α

La stimulation par le TNF-α, via sa liaison au récepteur TNFR1, active NF-κB, c'est-à-dire qu'IκB est rapidement phosphorylé afin d'être dégradé par le protéasome. La translocation du dimère NF-κB actif entraîne la transcription de nombreuses cytokines (IL-1β, IL-6 et de MMP-9), de molécules d'adhésion cellulaire, des facteurs antiapoptose (Bcl-2, Bcl-XL) et des molécules inflammatoires (Cox-2) (Modifié de Albanell et Adams, 2002)

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel

La lignée cellulaire dérivée d'un médulloblastome humain DAOY provient de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA), tout comme les lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains U87 et U251. Les milieux de culture MEM et DMEM high glucose, de même que la trypsine, la pénicilline/streptomycine (Penstrep) et le réactif TriZOL ont été obtenus de GIBCO BRL Life Technologies (Burlington, ON). Le sérum fœtal bovin (FBS) provient de HyClone Laboratories (Logan, UT). Les produits de transcription inverse (RT-PCR) ont été obtenus de Roche Molecular Biochemicals (Laval, QC). La Concanavaline A (ConA), les diverses catéchines, l'agarose, la gélatine, le dodécylsulfate de sodium (SDS), l'albumine sérique bovine (BSA) et le Triton X-100 ont été obtenus de Sigma (St-Louis, MO). Les solutions nécessaires au dosage des protéines par MicroBCA (acide bicinchoninique) et par Bradford (Coomassie Plus Protein Assay Reagent) proviennent de Pierce (Brockville, ON). Tous les produits utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE et la zymographie ont été obtenus de BioRad (Mississauga, ON). Les membranes de polyvinylidène difluorure (PVDF) proviennent de Boehringer Mannheim (Laval, QC). Le substrat chemiluminescent (ECL) utilisé pour l'immunodétection a été obtenue d'Amersham-Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, QC). Les anticorps primaires, P-Raf, Raf, P-Mek, Mek, P-Erk, Erk, P-p38, p38, Cox-2, I κ B, MT1-MMP et LRP85 proviennent de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris couplés à la peroxydase de raifort proviennent de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

2.2. Méthodes

2.2.1. Culture cellulaire

Les cellules U87 et DAOY ont été cultivées dans du milieu MEM enrichi de 1 mM de pyruvate, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 1.5 g/L de bicarbonate de sodium et 10 % (v/v) de FBS à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % CO₂ et 95 % d'air. Les cellules U251 ont été cultivées dans du milieu DMEM enrichi de 1 mM de pyruvate, de 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10 % (v/v) de FBS sous une atmosphère identique aux cellules U87 et DAOY.

2.2.2. Modèle de tumeurs expérimentales intracrâniennes

Toutes les expérimentations sur les animaux ont été évaluées et approuvées par le Comité institutionnel pour la protection des animaux (UQAM, QC). Des souris Crl :CD-1 –nuBR femelles de 5 à 10 semaines, préalablement anesthésiées, sont placées dans une chambre stéréotaxique où l'implantation de 5×10^4 cellules U87/5 µL de MEM⁻ est effectuée. L'implantation est faite dans le corpus droit à une profondeur de 0,35 mm et à 0,25 mm latéral du bregma à l'aide d'une seringue, calibre 10 µL, de type Hamilton. Après 5 minutes, la seringue est enlevée et la plaie est refermée avec des points de sutures. Les animaux sont sacrifiés entre 28 et 30 jours suivant l'implantation.

2.2.3. Isolation des cellules CD133⁺ par MACS et validation par cytométrie de flux

Les cellules à haute confluence ont été mises en présence d'un tampon de dissociation cellulaire, solution isotonique filtrée sans enzyme contenant de l'EDTA (Hank's based ; Invitrogen), centrifugées à 800 x g pour 5 minutes et resuspendues dans du PBS contenant 0.5 % BSA et 2 mM EDTA. La préparation cellulaire a ensuite été ajoutée à 100 µL d'anticorps (par 10^8 cellules) (AC133) couplé à des microbilles pour 30 minutes à 4 °C utilisant le kit d'isolation cellulaire CD133 direct (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Une quantité de 50 µL de 293C3 (CD133-2)-phycoérythrine (fluorochrome conjugué à un anticorps monoclonal de souris IgG2b ; Miltenyi Biotec) a été ajoutée pour un 10 minutes additionnel à 4 °C pour évaluer l'efficacité de la séparation magnétique par cytométrie de flux. La séparation magnétique a ensuite été exécutée à l'aide d'une colonne LS et d'un

MACS (Magnetic accelerate cell sorting) (Miltenyi Biotec) dans une hotte à flux laminaire. La fraction CD133⁺ a été éluée en enlevant la partie magnétique de la colonne. Des aliquots de cellules U87 CD133⁺ ont été évalués pour leur pureté par cytométrie de flux utilisant un FACS (Fluorescence accelerate cell sorting) (BD Biosciences, Mississauga, Canada). La fraction cellulaire CD133⁺ a été resuspendue dans son milieu de culture respectif.

2.2.4. Transfection transitoire des cellules U87 et DAOY

Les cellules U87 et DAOY ont été cultivées dans des plaques de 6 puits (9.8 cm²) jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 60 % de confluence, puis elles ont été sevrées pendant approximativement 1 heure avec du milieu de culture sans sérum. Elles ont ensuite été transfectées ; les expériences d'interférence d'ARN sont effectuées en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada). Un petit ARN interférent dirigé contre MT1-MMP (siMT1-MMP) et un siARN décalé, synthétisé par EZBiolab, inc. (Westfield, IN), ont été couplés afin de former un duplex. La séquence de siMT1-MMP utilisée dans cette étude est la suivante : 5'- CCAGAAGCUGAAGGUAGAAAdTdT-3' (sens) et 5' - UUCUACCUUCAGCUUCUGGdTdT-3' (antisens) (Neth et al., 2006). La transfection transitoire a été exécutée avec 20 nM siMT1-MMP pendant 24 heures et l'évaluation de la spécificité de la transfection a été faite par RT-PCR ou validée par l'évaluation de l'activation de la proMMP-2 par MT1-MMP en présence de concanavaleine A (Currie et al., 2007). La diminution de l'expression de MT1-MMP par RT-PCR se situe habituellement entre 75 % et 90 %.

2.2.5. Traitement des cellules

2.2.5.1 Traitement des cellules avec des facteurs de croissance variés

Les cellules, transfectées ou non, ont étéensemencées (à 1x10⁵ cellules/puits pour les U87 et à 5x10⁴ cellules/puits pour les DAOY) dans des plaques de 6 puits (9.8 cm²) et ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Lorsqu'elles ont atteint 80 % de confluence, les cellules ont été sevrées avec du milieu MEM sans sérum pendant 18 heures. Par la suite, un traitement spécifique a été administré avec divers facteurs de croissance aux concentrations suivantes : EGF et FGF (20 ng/mL), HGF, IGF et VEGF

(50 ng/mL), LIF, NSF et TNF (10 ng/mL), S1P, LPA et PMA (1 μ M), NorÉ (10 μ M), et CoCl_2 (100 μ M). Les traitements ont été effectués selon différents temps allant de 30 secondes à 18 heures. Pour les traitements de 18 heures, le sevrage des cellules et le traitement ont été effectués simultanément.

2.2.5.2 Traitement des cellules avec diverses catéchines

Les cellules U87 et DAOY ont été cultivées jusqu'à 80% de confluence. Elles ont ensuite été sevrées avec du milieu de culture sans sérum en absence ou en présence de 25 μ M de catéchines dont la catéchine (C), la catéchine gallate (Cg), l'épicatéchine (EC), l'épicatéchine gallate (ECg), l'épigallocatechine (EGC) et l'épigallocatechine gallate (EGCg) (sauf indication) pendant 4 heures ou 18 heures.

2.2.6. Récolte du milieu conditionné et lyse des cellules

À la suite des divers traitements, le milieu conditionné des cellules a été récolté, puis centrifugé à 2 000 rpm pendant 3 minutes pour éliminer les débris cellulaires en suspension. Le surnageant a été conservé à -80 °C jusqu'à utilisation. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid (phosphate-buffered saline) et grattées sur glace à l'aide d'un policeman dans du tampon de lyse contenant 10 mM de Tris/HCl pH 7.4, 1mM d'éthylènediamine tétra-acétate (EGTA), 150 mM de NaCl, 0.5 % (v/v) de Nonidet P-40 et 1 % (v/v) de Triton X-100. Ensuite, les cellules ont été lysées à 4 °C pendant 45 minutes avec agitation constante, puis le lysat a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires non solubilisés. Le lysat cellulaire (surnageant) a été conservé à -80 °C jusqu'à expérimentation ultérieure.

2.2.7. Dosage des protéines des échantillons selon la méthode microBCA

Puisque les détergents contenus dans le tampon de lyse interfèrent avec le dosage des protéines selon la méthode de Bradford, la concentration en protéines des lysats cellulaires a plutôt été mesurée par microBCA. Brièvement, un aliquot de chaque échantillon a été complété à 1 mL avec de l'eau nanopure et a ensuite été mélangé à 1 mL de réactif

microBCA (constitué à 50 % d'une solution A, 48 % de B et 2 % de C fournis par Pierce, Brockville, ON). Le tout a été chauffé 1 heure à 60 °C et l'absorbance de la solution a été lue au spectrophotomètre à 562 nm. L'équation de la courbe standard de BSA permet de calculer la concentration protéique des lysats.

2.2.8.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western

Les analyses électrophorétiques ont été réalisées à partir de la méthode de Laemmli (1970), légèrement modifiée. Les échantillons ont été agités durant 5 minutes dans un tampon contenant 62.5 mM de Tris/HCl pH 6.8, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (p/v) de SDS, 5 % (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0.00625 % (p/v) de bleu de bromophénol, puis ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Par la suite, ils ont été déposés sur gel SDS-PAGE 9%, 10 % et 12 % polyacrylamide (p/v). Les gels de séparation contenaient 9 % (p/v) d'acrylamide, 0.25 % (p/v) de N, N-méthylène-bis-acrylamide ; ou 10 % (p/v) d'acrylamide, 0.27 % (p/v) de N, N-méthylène-bis-acrylamide ; ou 12% (p/v) d'acrylamide, 0.29 % (p/v) de N, N-méthylène-bis-acrylamide; et 0.375 M de Tris/HCl pH 8.8, 0.1 % (p/v) de SDS, 1 μ L/mL de N, N, N', N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0.5 mg/mL de persulfate d'ammonium (APS). Les gels d'entassement étaient composés de 3.8 % (p/v) d'acrylamide, 0.1 % (p/v) de N, N-méthylène-bis-acrylamide, 0.125 M de Tris/HCl pH 6.8, 0.1 % (p/v) de SDS, 1 μ L/mL de TEMED et 0.5 mg/mL d'APS. La migration a été effectuée à 100 volts constants pendant 90 minutes sur un système d'électrophorèse MiniProtean II (BioRad, Mississauga, ON).

Les protéines ont été transférées pendant 90 minutes sur une membrane de PVDF de 0.45 μ m de porosité à 1 mA/cm² de gel en présence de tampon de transfert constitué de 96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10 % (v/v) de méthanol en utilisant un système Miliblot graphite electroblotter (Millipore). Les sites non spécifiques sur la membrane ont été bloqués en incubant celle-ci toute la nuit à 4 °C dans une solution de Tris salin (150 mM NaCl et 20 mM Tris-HCl pH 7.5) contenant 0.1 % (v/v) de Tween 20 (TBS-Tween) et 5 % (p/v) de lait non gras en poudre (Carnation).

2.2.9. Immunodétection des protéines

Les membranes de PVDF ont été lavées trois fois durant 15 minutes dans du TBS-Tween puis elles ont été incubées 1 heure dans une solution d'anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween contenant 3% (p/v) de BSA et 0.02 % (p/v) de NaN_3 . Ensuite, trois autres lavages de 15 minutes au TBS-Tween ont été effectués et les membranes ont été incubées 1 heure dans une solution d'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort diluée dans du TBS-Tween comprenant 5 % (p/v) de lait en poudre exempt de gras (Carnation). Les membranes ont encore subi trois lavages successifs de 15 minutes chacun dans du TBS-Tween et ont ensuite été incubées 1 minute dans la solution d'ECL et ont été révélées sur un film Fuji. Les bandes immunoréactives sur les autoradiogrammes correspondant aux protéines d'intérêts ont été quantifiées par densitométrie (Molecular Dynamics, Sunnyville, CA).

2.2.10. Zymographie

L'activité gélatinolytique des enzymes présentes dans le milieu conditionné des cellules a été mesurée par zymographie gélatine. Brièvement, les échantillons (20 μL de milieu conditionné) ont été agités 5 minutes avec du tampon contenant 62.5 mM de Tris/HCl pH 6.8, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (p/v) de SDS et 0.00625 % (p/v) de bleu de bromophénol, puis ils ont été déposés sur gel SDS-PAGE 9% comprenant 0.1 % (p/v) de gélatine. La migration a été effectuée à 100 volts pendant 90 minutes. Après l'électrophorèse, les enzymes ont été renaturées en lavant les gels deux fois pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de 2.5 % (v/v) Triton X-100, suivi de cinq rinçages à l'eau nanopure. Ils ont ensuite été incubés 18 heures à 37 °C dans le tampon de zymographie contenant 50 mM de Tris/HCl pH 7.6, 0.2 M de NaCl, 5 mM CaCl_2 et 0.02% (v/v) Brij-58. Les gels ont été colorés 1 heure avec une solution de 0.1% (p/v) bleu de Coomassie, 30 % (v/v) méthanol et 10 % (v/v) acide acétique et décoloré dans un mélange de 7.5 % (v/v) acide acétique et 30 % (v/v) méthanol. Finalement, les gels ont été séchés et l'activité gélatinolytique correspondant aux bandes non colorées sur fond bleu a été quantifiée par densitométrie (Molecular Dynamics, Sunnyville, CA).

Il est à noter que les proformes des MMPs peuvent aussi être visualisées par cette méthode puisqu'elles sont activées par la dénaturation au SDS qui déstabilise l'effet inhibiteur entre la cystéine du prodomaine et l'atome de zinc du site catalytique et que ce complexe ne peut se reformer par la renaturation au Triton X-100 (Springman et al., 1990). De plus, l'électrophorèse permet une séparation efficace des complexes protéases/inhibiteurs endogènes (Kleiner et Stetler-Stevenson, 1999).

2.2.11. Essais de migration cellulaire

Les essais de migration ont été effectués en utilisant des chambres de Boyden (Albini et al., 1987). Chaque filtre de migration (8 μm de porosité, Costar) a été recouvert d'une fine couche de gélatine, avec 200 μL d'une solution stérile de 0.5 % (p/v) de gélatine dissoute dans du PBS, et séché à la température ambiante dans une hotte à flux laminaire. Les chambres de migration ont ensuite été placées dans une plaque de 24 puits (Falcon 3097) dont les puits ont été remplis avec 600 μL de milieu de culture contenant 10% (v/v) de FBS et la chambre de migration a été remplie de 100 μL de cellules (5×10^4 cellules/mL de milieu de culture). La plaque a été incubée durant 6 heures à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 et 95 % d'air. Les cellules ont été fixées avec 10 % (v/v) de formaline et colorées avec une solution contenant 0.1 % de cristal violet et 20 % (v/v) de méthanol. Les cellules n'ayant pas migré ont été enlevées de la surface supérieure du filtre avec un écouvillon. Les cellules ayant migré jusqu'à la surface inférieure du filtre ont été comptées au microscope. Les résultats représentent la moyenne des cellules ayant migré pour 6 champs à un grossissement de 100X.

2.2.12. Extraction de l'ARN total des cellules

L'ARN total des cellules U87, U251 et DAOY a été isolé en utilisant le réactif TriZOL, une solution monophasique de phénol et de guanidine thiocyanate, selon les directives du fabricant (GIBCO BRL Life Technologies, Burlington, ON). L'ARN contenu dans les extraits a été quantifié par le nanovue (GE Healthcare Life Sciences, Baie-d'Urfé, QC).

2.2.13. Synthèse de l'ADNc et RT-PCR et PCR quantitative

Pour la synthèse d'ADNc, environ 1 µg d'ARN total a été transcrit en ADNc à l'aide du kit de transcription inverse (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'ADNc a été entreposé à -80 °C jusqu'à son utilisation. L'expression génique a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel utilisant le supermix iQ SYBR Green (BioRAD, Hercules, CA). L'amplification de l'ADN a été réalisée grâce à un Icycler iQ5 (BioRAD, Hercules, CA). et la détection du produit d'amplification a été obtenue par la mesure de la liaison de la fluorescence du supermix iQ SYBR Green à l'ADN double brin. Toutes les amorces utilisées proviennent de QIAGEN. Les échantillons ont été incubés 10 minutes à 95 °C et l'amplification des produits géniques par PCR s'est poursuivie selon les conditions suivantes (30 cycles) : 60 °C pendant 30 secondes, 72 °C durant 30 secondes et 55 °C pendant 10 secondes. Les produits de PCR quantitative ont été examinés sur gel d'agarose 1.8% (p/v) contenant 1µg/mL de bromure d'éthidium.

2.2.14. Iodation des protéines RAP et α_2 -Macroglobuline : essais de liaisons différentielles

Les protéines RAP et α_2 -Macroglobuline ont été radiomarquées selon les procédures standard utilisant un kit de billes iodées et une colonne de dextran prééquilibrée provenant de Pierce (Rockford, IL, USA). Un ratio de deux billes iodées par iodation a été utilisé pour l'essai. Brièvement, les billes ont été lavées deux fois avec 3 mL de PBS dans un filtre de style *Whatman* et resuspendues dans 60 µL de PBS, pH 6.5. Le Na[¹²⁵I] (1 mCi) de Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, QC) a été ajouté à la suspension de billes pour 5 minutes à 20 °C. L'iodation de chaque protéine fut initiée par l'addition de 100 µg de protéine (80-100µL) diluée dans 0.1 M d'une solution tampon de phosphate, pH 6.5. Suite à une incubation de 10 minutes à 20°C, les billes iodées sont enlevées et le surnageant est déposé sur une colonne contenant 5 mL de dextran (Pierce, Rockford, IL, USA). Les protéines-[¹²⁵I] sont éluées avec 10 mL de PBS. Des fractions de 0,5 mL sont recueillies afin de mesurer la radioactivité de 5µL de chacune de ces fractions. Les fractions correspondantes aux protéines-[¹²⁵I] sont regroupées et dialysées avec du Ringer/HEPES pH 7.4.

2.2.15. Essais d'internalisation et de liaison différentielles

Les cellules DAOY, traitées ou non, ont étéensemencées à 5×10^4 cellules/puits dans des plaques de 6 puits (9.8 cm^2) jusqu'à 80 % de confluence. Le milieu de culture a été remplacé par 500 μL de ^{125}I - $\alpha_2\text{M}^*$ (63,5 nCu/pmol) ou de ^{125}I -RAP* (4,6 nCu/pmol) dilué dans un tampon de liaison, 25 mM HEPES, pendant 4 heures à 4 °C. Les ligands non marqués ont été enlevés et la monocouche de cellules a été soigneusement lavée avec du PBS froid 0.1 % (v/v) BSA. Les cellules ont été lysées dans 1 mL de NaOH 1N à température pièce pour une période de 3 heures préalables au comptage. La liaison spécifique du ^{125}I - $\alpha_2\text{M}^*$ ou de ^{125}I -RAP* avec les cellules a été déterminée en soustrayant les liaisons des ligands non marqués au total de liaison.

2.2.16. Essais de prolifération cellulaire

Trois semaines suite au tri magnétique, 1×10^4 cellules/ puit ont étéensemencées (U87, U251 et DAOY) dans leurs milieux cellulaires respectifs contenant du sérum, dans des plaques de 6 puits (9.8 cm^2). Un compte cellulaire a été effectué à l'hémacytomètre pendant 4 jours, par tranche de 24 heures.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. Isolation des cellules U87 CD133⁺ et DAOY CD133⁺

Afin d'isoler la sous-population de cellules CD133⁺ des cellules U87 et DAOY parentales, la technologie du MACS (*Magnetic accelerate cell sorting*) fut utilisée. La quantification de cette sous-population fut déterminée grâce à la cytométrie de flux (FACS ; *Fluorescence activated cell sorting*) à 0,15 % des cellules U87 parentales totales (Fig. 3.1A) et à 8,15 % des cellules DAOY parentales totales (Fig. 3.1B). Après isolation de ces sous-populations CD133⁺, l'enrichissement de ces cellules est à nouveau évalué et déterminé à 27 % pour les U87 et à 51,76 % pour les DAOY (fig. 3.1A et B, à droite). On obtient un enrichissement de 180 fois pour la population U87 et de 6 fois pour la population DAOY. L'ARN total fut extrait des cellules parentales et CD133⁺ afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes CD133 et β -actine. Une expression du gène CD133 plus importante dans les cellules CD133⁺, de l'ordre de 6 fois, est observée dans les cellules U87 CD133⁺ (Fig. 3.1C) et de 4 fois dans les cellules DAOY CD133⁺ (Fig. 3.1D).

3.2. Effets des facteurs de croissance comme inducteurs de la voie de signalisation MAP Kinase

Afin de caractériser la contribution des voies de signalisation dans les cellules U87 parentales et CD133⁺, divers facteurs de croissance ont été utilisés. La stimulation avec les facteurs de croissance dont l'EGF, le FGF, le HGF, l'IGF, le LIF, le NSF, le S1P, le LPA, le VEGF et la norépinéphrine, entraîne une phosphorylation plus importante de la MAP1K Raf dans les cellules U87 CD133⁺. On observe une induction marquée avec le S1P et le LPA autant dans

les cellules U87 parentales (1,2 et 1,5 fois, respectivement) que dans les U87 CD133⁺ (2,0 et 2,3 fois, respectivement) (Fig. 3.2A). Par contre, la phosphorylation de la MAP2K Mek, par l'ensemble des facteurs de croissance, est plus élevée dans les cellules U87 parentales. On constate toujours une forte induction en présence de S1P et de LPA et ce, pour les deux populations cellulaires soit d'environ 3 fois (pour le S1P et le LPA) dans les U87 parentales, de 4 et 3,5 fois respectivement dans les U87 CD133⁺ (Fig. 3.2 B). Finalement, l'induction de la phosphorylation de la MAP3K Erk (P-Erk) ne diverge pas de façon significative entre les deux lignées cellulaires et on peut identifier encore une fois le S1P et le LPA comme stimulants majeurs (Fig. 3.2C). Une seconde voie des MAP kinases a été analysée, il s'agit de la kinase p38, où l'on remarque le plus de divergences entre les deux populations cellulaires pour un même inducteur. En effet, on observe une phosphorylation différentielle considérable avec le S1P et le LPA, soit de 2,5 fois plus importante dans les U87 CD133⁺ (S1P) et de 3 fois plus importante dans les U87 parentales (LPA), entre les deux lignées cellulaires (Fig. 3.2D).

3.3. Essais de migration cellulaire en présence de S1P et de LPA

La stimulation des voies des MAP kinases avec une variété de facteurs de croissance a permis l'identification de S1P et de LPA comme inducteurs prédominants parmi ceux testés. Suite à cette analyse, on a effectué des essais de migration cellulaire avec les U87 parentales ainsi qu'avec les U87 CD133⁺ en présence des deux lysophospholipides. L'optimisation des conditions de la migration sans chémoattractants fut, dans un premier temps, effectuée avec trois densités cellulaires et pour des périodes de 3, 6 et 24 heures de migration dans les U87 parentales. On obtient une saturation du filtre à la suite d'une incubation de 24 heures tandis qu'une incubation de 3 heures semble faiblement quantifiable, et ce, pour les trois densités de cellules (Fig. 3.3A). L'utilisation du logiciel *Northern Eclipse* a permis la quantification de la migration et a démontré une augmentation de celle-ci en fonction du temps et de la densité cellulaire (Fig. 3.3B). Ainsi, une quantité de 5.0×10^4 cellules/ filtres pour une durée de 6 heures fut choisie pour l'expérimentation. Les essais de migration cellulaire avec les lysophospholipides démontrent une réponse plus prononcée en présence de S1P (≈ 2.5 fois) et de LPA (≈ 5 fois) dans les cellules U87 CD133⁺, et ce, à une concentration de 1 μ M. Le S1P induit de façon transitoire la migration cellulaire, car elle décroît fortement à 10 μ M

(Fig. 3.4A), tandis que le LPA maintient l'induction de la migration au-delà de 10 μ M (Fig. 3.4 B).

3.4. Induction préférentielle de la phosphorylation de Erk par le S1P et le LPA dans les U87 CD133⁺

Par la suite, la signalisation intracellulaire induite par le S1P/LPA a été analysée dans les deux populations cellulaires par la quantification de P-Erk, exprimée par le ratio P-Erk/Erk. Une cinétique en présence de S1P ou de LPA fut établie entre 0 et 10 minutes afin d'identifier le temps optimal de stimulation de la phosphorylation de Erk (fig. 3.5A et B). Grâce à cet échantillonnage, des temps d'une minute et de deux minutes pour la stimulation au S1P et au LPA, respectivement, ont été choisis. À ces temps, on remarque une phosphorylation plus importante de Erk dans les cellules U87 CD133⁺, qui est confirmée par la comparaison des ratio P-Erk/Erk soit de 7.9 et de 4.8 dans les U87 CD133⁺ et, de 2.1 et 1.7 dans les U87 parentales en présence de S1P (fig. 3.6A) et de LPA (fig. 3.6 B).

3.5. Expression génique des récepteurs spécifiques au S1P et au LPA

L'analyse relative de l'expression génique des récepteurs du S1P et du LPA dans les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ a été effectuée par qRT-PCR. Les récepteurs S1P-1, S1P-2, S1P-4, LPA-1 et LPA-3 sont exprimés de façon significative dans la sous-population CD133⁺ (Fig. 3.7A). La validation des amorces fut effectuée par RT-PCR afin de confirmer la présence d'un seul amplicon produit (Fig. 3.7B). On observe une certaine corrélation de l'expression génique des récepteurs du S1P/LPA entre les résultats *in vitro* et ceux obtenus *in vivo* de tumeurs intracrâniennes implantées expérimentalement. Ainsi, on remarque une forte expression des récepteurs S1P-1, S1P-2 et LPA-1 *in vitro* et *in vivo*, mais les récepteurs S1P-4 et LPA-3 ne sont pas exprimés à la hausse dans la partie *in vivo* de l'étude (Fig. 3.7C).

3.6. Implication de MT1-MMP au cours de la migration et de la prolifération cellulaire induites par le S1P et le LPA

Afin d'évaluer la contribution de MT1-MMP dans les cellules U87 CD133⁺ au cours de la migration cellulaire en présence des lysophospholipides, on a utilisé la stratégie d'ARN interférent ciblant l'activité spécifique de MT1-MMP. Cette transfection a été réalisée dans les cellules U87 parentales et CD133⁺ et, comparée aux cellules non transfectées (Mock). La

transfection a été validée par le traitement des cellules à la concanavaline A, une lectine capable d'induire l'activation de la pro-MMP-2 via un mécanisme impliquant les fonctions MT1-MMP. La zymographie confirme que l'expression génique de MT1-MMP dans les cellules transfectées (siMT1) est diminuée (Fig. 3.8A). Les essais de migration cellulaire ont démontré que ni le S1P, ni le LPA ne peuvent induire la migration cellulaire dans les cellules U87 parentales où le gène MT1-MMP est réprimé. L'incapacité du S1P à induire la migration cellulaire est aussi retrouvée dans les cellules U87 CD133⁺ transfectées avec l'ARN interférant siMT1-MMP. Par contre, la régulation à la baisse de MT1-MMP ne semble pas affecter la migration cellulaire induite par le LPA dans les U87 CD133⁺ (Fig. 3.8B). On observe les mêmes effets sur P-Erk en présence de S1P et de LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺ transfectées (Fig. 3.8C).

3.7. Ciblage pharmacologique des voies de signalisation par les catéchines

3.7.1. Détermination d'une dose non cytotoxique d'EGCg

Les réponses différentielles des cellules U87 parentales et CD133⁺ face au S1P et au LPA dans les processus de migration et de prolifération cellulaire ont été cibler pharmacologiquement. Pour ce faire, on a utilisé des molécules naturelles, des polyphénols que l'on retrouve dans notre alimentation, démontrant des propriétés antioxydantes et antiangiogéniques, afin de comparer leurs effets dans les deux populations cellulaires au niveau des voies de signalisation. Dans un premier temps, des concentrations croissantes d'épigallocatechine gallate (EGCg) (catéchine la plus puissante) soit de 5, 10, 50 et 75µM ont été ajoutées aux doses de S1P/LPA (1µM) afin d'observer les effets sur la phosphorylation de la MAP3K Erk. En présence de S1P, on constate une diminution radicale de P-Erk à 50 et 75µM d'EGCg et ce, dans les deux populations cellulaires mais légèrement plus prononcée dans les U87 CD133⁺ (Fig. 3.9A). En revanche, on observe plutôt une diminution graduelle en présence de LPA qui débute dès l'addition de 5µM d'EGCg (Fig. 3.9B). La phosphorylation de Erk est moins affectée à une concentration de 50µM d'EGCg que lors de la stimulation au S1P. Néanmoins, on observe la même inhibition, quasi totale, de P-Erk à 75µM d'EGCg autant avec le S1P que le LPA et ce, plus grande dans les U87 CD133⁺. Il fut établi que les catéchines seront utilisées à une concentration de 25µM.

3.7.2. Modulation de la signalisation par les catéchines

Ayant identifié une concentration non cytotoxique à partir de l'EGCg, on a utilisé six catéchines pour un traitement de 18 heures, soit la catéchine (C), la catéchine gallate (Cg), l'épicatéchine (EC), l'épicatéchine gallate (ECg), l'épigallocatechine (EGC) ainsi que l'EGCg pour les expériences subséquentes (Fig. 3.10). Dans les U87 parentales, on observe une diminution similaire du ratio P-Erk/Erk suite au traitement combiné des inhibiteurs Cg, EC et EGCg au S1P, soit d'environ 1.5 fois. L'ajout d'EGCg diminue de plus de 3 fois ce ratio. Par contre, on ne remarque aucun effet inhibiteur avec C et EGC n'affecte pas significativement ce ratio. Dans les U87 CD133⁺, une diminution du ratio P-Erk/Erk est constatée avec toutes les catéchines où EGCg est l'inhibiteur le plus puissant de l'ordre de 3 fois (Fig. 3.11A). L'ajout de catéchines au LPA n'entraîne aucun effet sur le ratio P-Erk/Erk dans les U87 parentales sauf une faible augmentation avec C et Cg. Pour ce qui est des U87 CD133⁺, les catéchines accentuent l'effet du LPA en augmentant ce ratio. L'ECg est la seule catéchine à entraîner une faible diminution de P-Erk (Fig. 3.11B).

La même expérience a été entamée en préincubant les cellules avec les catéchines pour 4 heures seulement. Ainsi, on observe une induction considérable de P-Erk à l'ajout de toutes les catéchines au S1P dans les U87 parentales en comparaison de l'induction par le S1P seul (5 fois). Par contre, l'EGCg seul entraîne une inhibition complète de P-Erk et l'ajout de S1P à cette catéchine amène une légère phosphorylation à peine quantifiable. On constate le même profil dans les U87 CD133⁺ c'est-à-dire une inhibition de la phosphorylation de Erk à l'ajout d'EGCg au S1P (et d'EGCg seul). La catéchine C affecte de 2 fois P-Erk tandis que Cg et ECg amènent une légère diminution de P-Erk. Ainsi, on aperçoit un niveau d'induction plus élevé dans les U87 parentales avec les diverses catéchines (sauf EGCg) que dans les U87 CD133⁺ (Fig. 3.12A). L'addition d'EGCg au LPA entraîne la même tendance qu'avec le S1P et ce, dans les U87 parentales et CD133⁺. À l'opposé, l'ajout des autres catéchines au LPA altère considérablement P-Erk. Dans les U87 parentales, on observe une diminution de P-Erk de plus de 2 fois avec Cg, EC, ECg et EGC (+LPA) par rapport à l'induction de 4 fois par le LPA seul. Dans les U87 CD133⁺, on distingue une diminution de P-Erk de plus de 2 fois avec les catéchines C, Cg, ECg et EGC (+LPA) par rapport à l'induction de 8 fois par le LPA seul (Fig. 3.12B).

3.7.3. Modulation de la cyclooxygénase 2 par les catéchines

Cox 2 est impliqué dans la progression, l'invasion et l'angiogenèse de plusieurs néoplasies incluant certaines tumeurs gliales (Wang et Dubois, 2008). Suite aux résultats obtenus avec les diverses catéchines et le S1P/LPA, des essais ont été effectués afin d'observer les effets des catéchines sur la protéine Cox 2. Ces expériences sur la modulation de Cox 2 ont été effectuées exclusivement avec le LPA vu son potentiel plus élevé que celui du S1P à induire la signalisation (Section 3.2). Pour ce faire, un traitement combiné de chaque catéchines avec le LPA (1 μ M) pendant 24 heures a été analysé. Dans les U87 parentales, on observe une diminution de Cox 2 en présence de Cg, de l'ordre de 2 fois, et en présence d'EGCg d'environ 2 fois aussi (Fig. 3.13A). Par contre, l'addition des catéchines C, EC, ECg et EGC au LPA augmente l'expression protéique de Cox 2 et ce, jusqu'à 4 fois pour certaines d'entre elles. Dans les U87 CD133⁺, on remarque en premier l'induction de Cox 2 par le LPA seul de 10 fois, ce qui est plus important que dans les U87 parentales où l'on a une induction de 3 fois. Toutes les catéchines potentialisent l'effet du LPA en augmentant jusqu'à 3 fois l'expression de Cox 2. Seul l'EGCg affecte cette protéine dans les U87 CD133⁺ en diminuant son expression de 3 fois (Fig. 3.13B).

3.8. Expression génique différentielle de Cox 2 et des LRPs suite à divers traitements

Afin de poursuivre l'expertise au niveau de la survie et de l'invasion des cellules cancéreuses, divers traitements, dont le TNF, le PMA et le CoCl₂ ont été utilisés afin de mimer un environnement pro-inflammatoire, procarcinogène et prohypoxique. Une analyse approfondie a été effectuée sur l'expression génique des LRPs et de Cox 2, et de l'activité de la MMP-9 au sein de trois lignées cellulaires cancéreuses dont deux glioblastomes (U87 et U251) ainsi qu'avec une lignée de médulloblastome (DAOY).

3.8.1. Expression génique différentielle de Cox 2 dans les U87, U251 et DAOY parentales et CD133⁺

L'analyse de l'expression génique de Cox 2 a été réalisée suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂, dans les cellules parentales et CD133⁺ des trois lignées cellulaires testées. Dans les U87, on remarque que le TNF augmente l'expression génique de Cox 2 dans les cellules parentales (10 fois) et CD133⁺ (15 fois). Également, le PMA induit son expression d'environ

40 fois, et ce, autant dans les cellules parentales que CD133⁺. À l'opposé, le CoCl₂ n'affecte pas l'expression de Cox 2 dans les cellules U87 (Fig. 3.14A). Dans les U251, on observe un effet similaire du TNF c'est-à-dire, une expression génique de Cox 2 supérieure dans les cellules CD133⁺ (8 fois) que dans les cellules parentales (5 fois) suite au traitement. Par contre, le PMA semble influencer davantage Cox 2 dans les cellules parentales (25 fois) que dans les cellules CD133⁺ (6 fois). Finalement, le CoCl₂ n'interagit pas sur l'expression génique de Cox 2 dans cette lignée cellulaire (Fig. 3.14B). Dans les DAOY, on peut constater que le TNF et le PMA augmentent l'expression de Cox 2 et ce, de 5 fois chacun tandis que le CoCl₂ l'augmente d'environ 4 fois dans les DAOY parentales. Du côté des DAOY CD133⁺, on remarque une diminution de l'expression de Cox 2 avec les trois traitements d'environ 2 fois pour le TNF et le CoCl₂ et moins marquée avec le PMA (Fig. 3.14C).

3.8.2. Activité différentielle de la MMP-9 par le TNF, le PMA et le CoCl₂

Dans un premier temps, des zymographies ont été faites afin d'évaluer l'effet des trois traitements sur la MMP-9 dans les trois lignées cellulaires. Dans les U87, on ne décèle aucun effet différentiel entre la population Parentale et CD133⁺. En effet, le PMA stimule la MMP-9 de l'ordre de 12 fois au sein des deux populations cellulaires alors que, le TNF et le CoCl₂ n'affectent en rien son expression (Fig. 3.15A). Dans les cellules U251, on observe une stimulation de la MMP-9 par le TNF de 22 fois et par le PMA de 18 fois pour la population Parentale. On dénote également une augmentation de la MMP-9 dans les U251 CD133⁺ mais moins intense, d'environ 4 fois pour le TNF et le PMA. Le CoCl₂ double l'expression de la MMP-9 dans les U251 parentales mais semble inhiber complètement celle-ci dans les U87 CD133⁺ (Fig. 3.16A). Dans les DAOY, l'expression de la MMP-9 est augmentée avec le TNF de 4 fois et de 3 fois dans les parentales et CD133⁺ respectivement. Le PMA stimule davantage son activation soit de 9 fois dans les parentales et de 12 fois dans les CD133⁺. Enfin, le CoCl₂ n'affecte pas l'expression de la MMP-9 dans les deux populations cellulaires (Fig. 3.17A).

3.8.3. Expression génique des LRP des cellules U87 parentales et CD133⁺

Dans cette lignée, l'analyse a porté sur l'expression différentielle de LRP-1, LRP-1b, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. LRP-2 et LRP-5 ne sont pas exprimés dans les U87. L'expression de LRP-1 à la suite des traitements ne diverge pas de façon significative dans les U87 parentales et CD133⁺. Par contre, le TNF semble augmenter faiblement son expression dans les U87 parentales. Notamment, ce stimulant augmente l'expression génique de LRP-1b soit de 7 fois dans les U87 parentales et d'environ 2 fois dans les CD133⁺. Le PMA et le CoCl₂ diminuent LRP-1b de deux fois chacun dans les U87 parentales tandis que dans les CD133⁺ une légère diminution est constatée. LRP-8 est aussi augmenté par le TNF de 2 fois dans les U87 parentales mais n'est pas affecté dans les CD133⁺. On ne dénote aucun effet différentiel considérable de LDL-R après les stimulations. Les trois traitements augmentent l'expression de vLDL-R et ce, dans les deux populations cellulaires, mais cette augmentation est plus importante dans les U87 parentales. De base, vLDL-R est le seul à être exprimé à la hausse dans les U87 CD133⁺, tous les autres LRP étudiés se révèlent plus appréciables dans les U87 parentales (Fig. 3.15 B).

3.8.4. Expression génique des LRP des cellules U251 parentales et CD133⁺

Dans cette lignée, l'analyse a porté sur l'expression différentielle de LRP-1, LRP-2, LRP-5, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. LRP-1b n'est pas exprimé dans les U251. Le PMA augmente l'expression de LRP-1 et de LRP-5 de près de 20 fois chacun dans les U251 parentales. Ces deux LRP ne sont pas modifiés avec les autres traitements dans les deux populations cellulaires. L'expression de LRP-2 augmente de 5 fois dans les U251 parentales tandis que l'on remarque une diminution de 2 fois dans les U251 CD133⁺ suite à la stimulation au PMA. Le TNF influence également LRP-2 de façon différentielle : on constate cette expression à la hausse de 5 fois dans les U251 parentales et de 8 fois dans les U251 CD133⁺. Finalement, le CoCl₂ élève l'expression de LRP-2 de 4 fois dans les U251 parentales et CD133⁺. LRP-8 est affecté par le TNF et le PMA de l'ordre de 2 fois et de près de 30 fois dans les U251 parentales et, d'environ 2 fois respectivement pour chacun dans les U251 CD133⁺. Le traitement au PMA est le seul à modifier l'expression de LDL-R, on observe une hausse de 20 fois dans les U251 parentales et de 2 fois dans les U251 CD133⁺. Quant au vLDL-R, son expression est accrue de 5 fois avec le PMA dans les U251 parentales. De base, on relève

l'expression de LRP-2 et de vLDL-R à la hausse dans la population CD133⁺ et ce, d'environ 2 fois chacun (Fig. 3.16 B).

3.8.5. Expression génique des LRP des cellules DAOY parentales et CD133⁺

Dans cette lignée, l'analyse a porté sur l'expression différentielle de LRP-1, LRP-5, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. LRP-1b et LRP-2 ne sont pas exprimés dans les DAOY. L'expression de LRP-1 est augmentée d'environ 3 à 4 fois par le TNF et le CoCl₂ dans les DAOY parentales. Par contre, on remarque plutôt une diminution de celui-ci de l'ordre de 8 fois à la suite des trois traitements dans les DAOY CD133⁺. Dans les DAOY parentales, l'expression de LRP-5 est augmentée de 3 fois par le TNF. On dénote également une diminution de 12 fois de LRP-5 dans les DAOY CD133⁺ avec tous les traitements. L'expression de LRP-8 est stimulée par le TNF de 6 fois et de 4 fois par le PMA dans les DAOY parentales. Encore ici, une diminution de LRP-8 est observée dans les DAOY CD133⁺ de 6 fois avec le TNF et le PMA, et plus accentué avec le CoCl₂. Le TNF augmente l'expression de LDL-R de 3 fois et de 2 fois l'expression de vLDL-R qui est également augmentée par le CoCl₂ de 3 fois dans les DAOY parentales. Finalement, on obtient toujours la même tendance dans les DAOY CD133⁺, soit une expression à la baisse suite aux divers traitements de 12 fois pour le LDL-R et d'environ 20 fois pour le vLDL-R. La lignée cellulaire DAOY est celle qui démontre le plus de variations au niveau de l'expression génique, sans stimulation, des différents LRPs. En effet, on dénote l'expression de tous les LRPs testés à la hausse dans la population cellulaire CD133⁺ oscillant entre 8 et 25 fois supérieure à la population cellulaire Parentale (Fig. 3.17B).

Suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂, les résultats différentiels les plus significatifs entre les cellules parentales et CD133⁺, tant au niveau de l'expression génique des LDLs qu'au niveau de l'expression génique de Cox 2, ont été obtenus dans la lignée cellulaire DAOY. À cette fin, l'étude a été poursuivie avec la lignée cellulaire DAOY exclusivement.

3.9. Liaison et internalisation de RAP et de l' α_2 -Macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺

Suite à l'expression différentielle des LDLs au sein des DAOY parentales et CD133⁺, des essais d'internalisation des protéines RAP et α_2 -Macroglobuline radiomarquées ont été effectués suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂. L' α_2 -Macroglobuline est un ligand bien connu des récepteurs LDLs tandis que la protéine RAP agit en tant que récepteur associé qui antagonise la liaison entre le LRP et son ligand. La liaison à la protéine RAP est augmentée dans les cellules traitées au CoCl₂, cette augmentation est plus importante dans les cellules DAOY CD133⁺ (2 fois). Les traitements au TNF et au PMA n'entraînent pas de variations au niveau de la liaison à RAP et ce, dans les deux populations cellulaires (Fig. 3.18A). La liaison à l' α_2 -Macroglobuline est également augmentée dans les cellules traitées au CoCl₂ mais cette fois-ci, l'augmentation est plus considérable dans les cellules DAOY parentales. Le TNF et le PMA augmentent faiblement le taux de liaison à cette protéine dans les DAOY parentales tandis que le TNF n'entraîne aucune variation de liaison et que le PMA l'augmente significativement (plus de 2 fois) dans les DAOY CD133⁺ (Fig. 3.18B).

3.10. Modulation protéique d'I κ B, de Cox 2, de MT1-MMP et de LRP85 par siMT1-MMP dans les DAOY parentales et CD133⁺

La contribution de MT1-MMP a également été analysée dans la signalisation intracellulaire induite par le TNF, le PMA et le CoCl₂. Pour ce faire, une analyse de l'expression protéique d'I κ B, de Cox 2, de MT1-MMP et de LRP85 a été réalisée au sein des cellules DAOY parentales et CD133⁺ transfectées avec siMT1-MMP. De plus, un essai d'internalisation a été effectué dans ces cellules transfectées afin d'identifier le rôle de MT1-MMP au cours de la liaison entre le LRP et son ligand.

Le profil d'expression protéique d'I κ B (Fig. 3.19A) est semblable dans les deux populations cellulaires, c'est-à-dire une diminution de 50% d'I κ B suite aux divers traitements dans les cellules siMT1-MMP. Par contre, l'expression protéique de Cox 2 dans les cellules transfectées augmente considérablement suite aux traitements TNF et PMA et ce, de façon plus prononcée dans les DAOY CD133⁺. La régulation à la baisse de MT1-MMP affecte

l'induction de Cox 2 (Fig. 3.19B) par le CoCl_2 dans les DAOY parentales mais cette perturbation n'est pas retrouvée dans les DAOY CD133^+ . En effet le CoCl_2 augmente de près de 10 fois l'expression protéique de Cox 2 dans les DAOY CD133^+ transfectées. La transfection de siMT1-MMP amène une diminution de 50% de l'expression protéique de MT1-MMP (Fig. 3.19C) suite aux trois traitements dans les DAOY parentales. On observe également cette baisse dans les DAOY CD133^+ transfectées. Pour ce qui est de l'expression protéique de LRP85 (Fig. 3.19D), on observe une augmentation de 2 fois dans les deux populations cellulaires transfectées. Par contre, les trois traitements subséquents, qui augmentent l'expression protéique de LRP85 dans les cellules Mock, n'entraînent pas d'augmentation considérable de LRP85 dans les cellules siMT1-MMP. Seul le PMA semble augmenter significativement LRP85 suite à la transfection dans les cellules DAOY CD133^+ .

3.11. Modulation de l'activité de MMP-9 par siMT1-MMP dans les cellules DAOY parentales et CD133^+

L'activité de la MMP-9, suite aux traitements TNF, PMA et CoCl_2 , a également été analysée suite à la transfection dans les DAOY parentales (Fig. 3.20A) et CD133^+ (Fig. 3.20 B). On remarque la même tendance dans les deux populations cellulaires. Le TNF augmente l'expression de la MMP-9 (3 fois) dans les cellules Mock, et dans les cellules transfectées, on observe le maintien de cette induction dans les U87 CD133^+ mais une légère diminution dans les U87 parentales. Le PMA augmente l'expression protéique de la MMP-9 autant dans les cellules Mock (10 fois) que dans les cellules transfectées (environ 15 fois) et cette stimulation n'est pas perturbée par le siMT1-MMP, au contraire, on retrouve une induction de l'expression protéique plus importante par le PMA dans les cellules siMT1-MMP et ce, dans les deux populations cellulaires. Finalement, le CoCl_2 augmente de 2 fois la MMP-9 dans les cellules Mock et cette stimulation perdure dans les cellules DAOY CD133^+ tandis qu'elle est faiblement affectée dans les cellules DAOY parentales.

3.12. Liaison et internalisation différentielle de RAP et de l' α_2 -Macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺ transfectées avec siMT1-MMP

Afin d'identifier la contribution de MT1-MMP lors de la liaison entre RAP/ α_2 -Macroglobuline et les différents LRPs, un essai d'internalisation a été effectué avec les cellules DAOY parentales et CD133⁺ transfectées. (Cet essai a été plutôt stressant pour les cellules; une transfection de 24 heures suivie d'un traitement de 18 heures au TNF, PMA ou CoCl₂, ce qui a influencé l'analyse des résultats.) D'ailleurs, cet essai a été effectué avec des cellules moins confluentes en comparaison à l'essai de liaison sans transfection. Néanmoins, on peut observer que le niveau de liaison à la protéine RAP des cellules Mock traitées au CoCl₂ est augmenté. Le PMA semble aussi augmenter ce niveau dans les cellules Mock DAOY parentales. À la suite de la transfection siMT1-MMP, on constate une inhibition complète de cette stimulation dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺ (Fig. 3.21A). La liaison à la protéine α_2 -Macroglobuline est aussi augmentée en présence de CoCl₂ dans les cellules Mock DAOY parentales, et CD133⁺ où l'on remarque également une augmentation de liaison suite au traitement au PMA. Cette augmentation de liaison est abolie suite à la transfection dans les deux populations cellulaires (Fig. 3.21B). La validation de la transfection a été exécutée par RT-PCR quantitative (Fig. 3.21C).

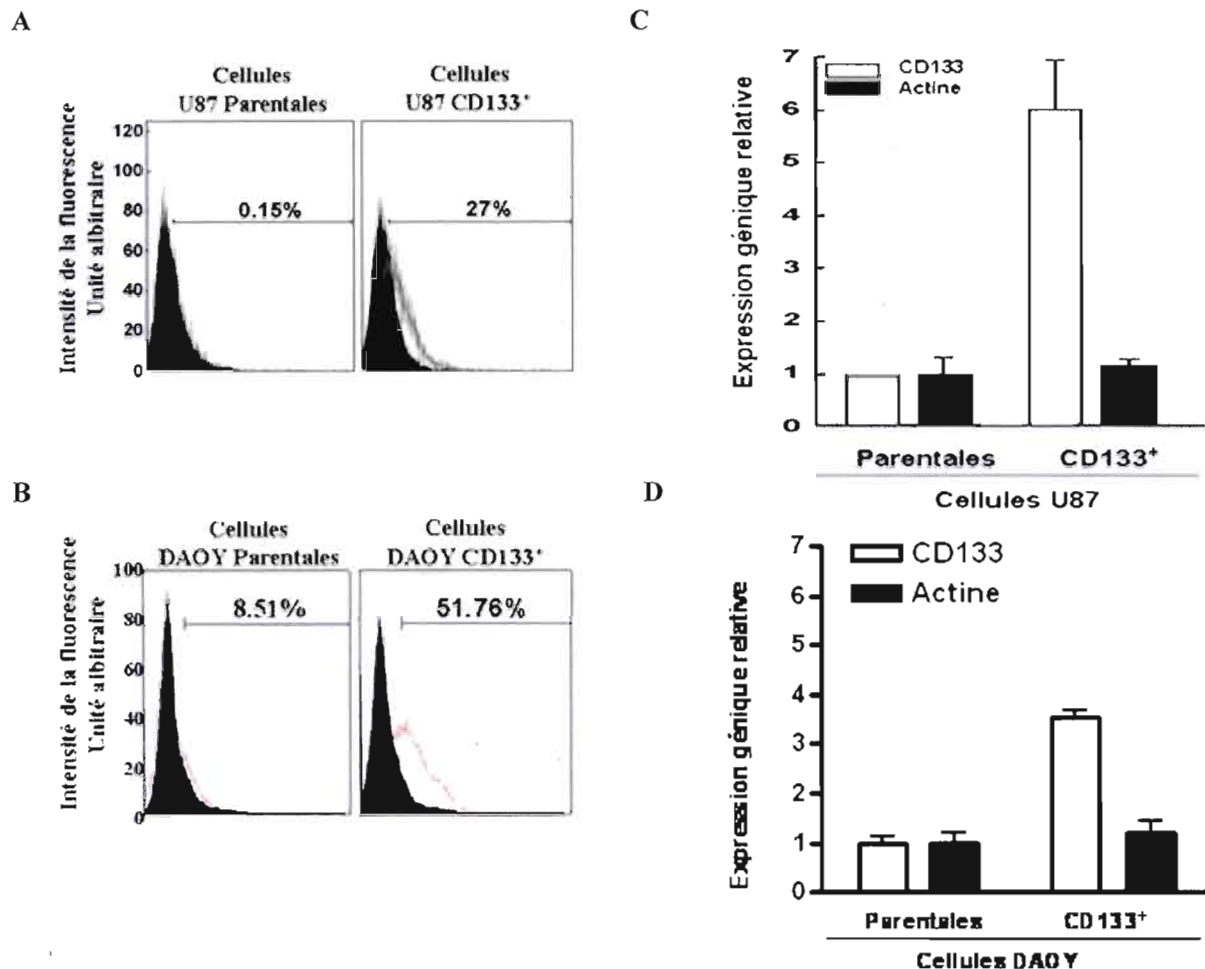
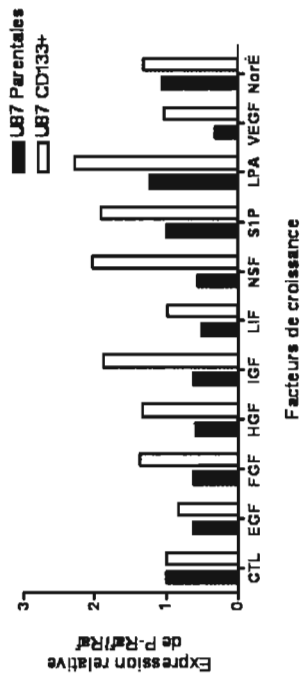
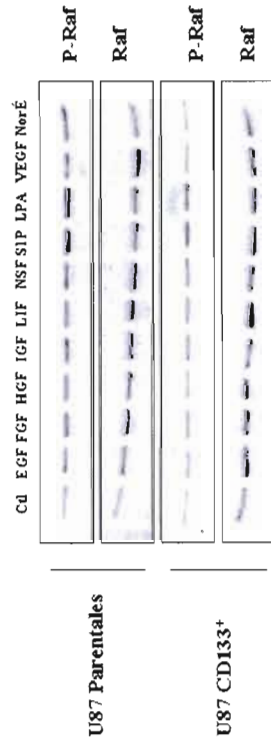


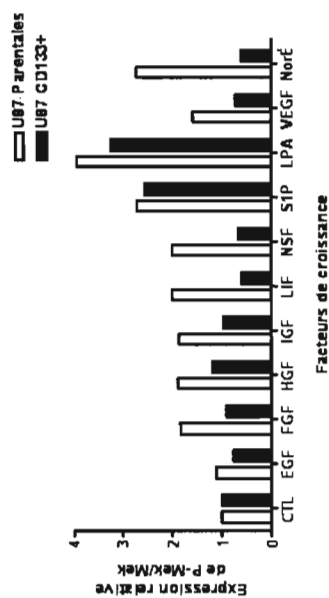
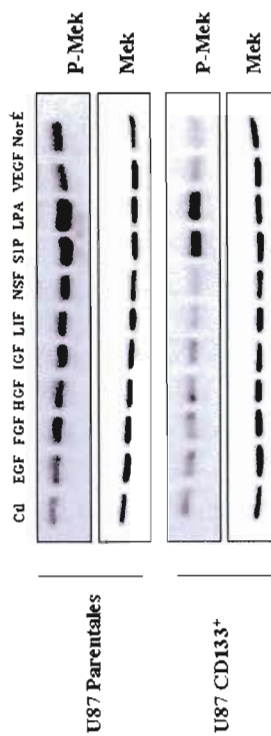
Figure 3.1 : Isolation des cellules U87 CD133⁺ et DAOY CD133⁺

Les cellules CD133⁺ sont isolées à partir des cellules parentales respectives pour chaque lignée cellulaire tel que décrit dans la section Matériel et Méthode à l'aide de la technologie du MACS. L'évaluation de l'expression de CD133 à la surface cellulaire est effectuée par cytométrie de flux sur la population parentale ainsi que sur la population isolée CD133⁺. A) La population cellulaire U87 Parentale exprime 0,15% de positivité CD133 et la population cellulaire U87 CD133⁺ isolée en exprime 27%. B) La population cellulaire DAOY Parentale exprime 8,15% de positivité CD133 et la population cellulaire U87 CD133⁺ isolée en exprime 51,76%. C) L'extraction de l'ARN total à partir des cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ (barres noires) est exécutée afin de procéder à une RT-PCR quantitative pour évaluer le degré d'expression relatif du gène CD133 (barres blanches) et de β -actine (gène de référence) (barres noires). Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

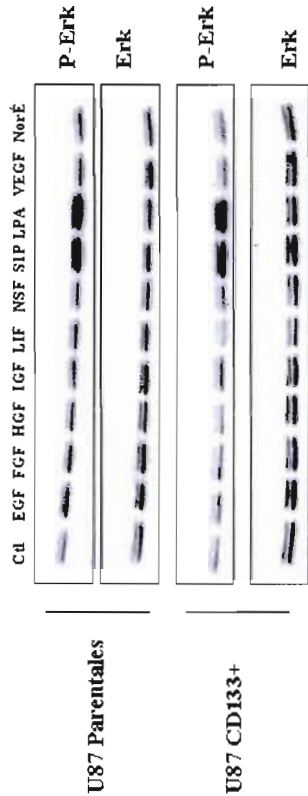
A



B



C



D

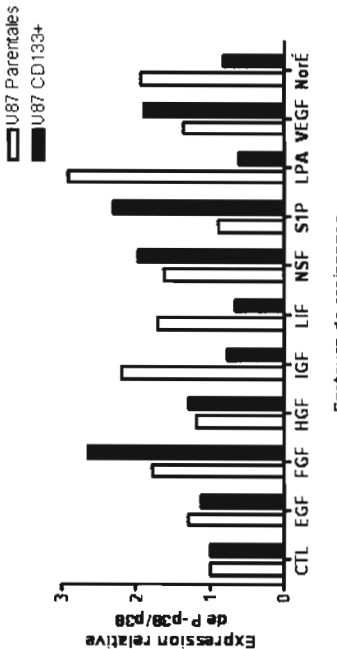
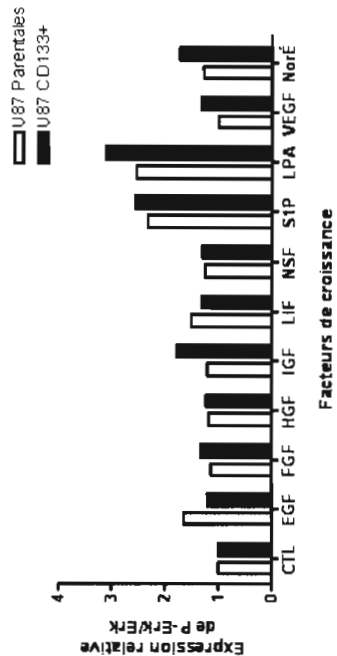
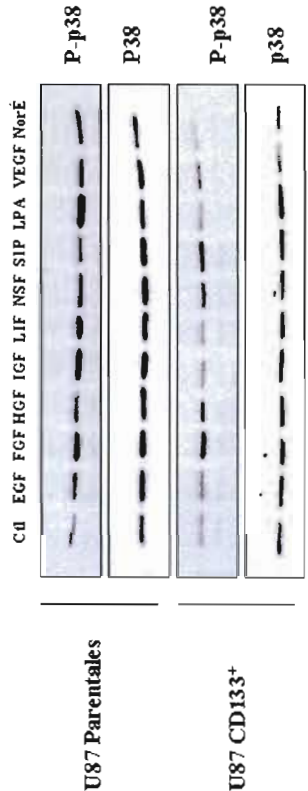
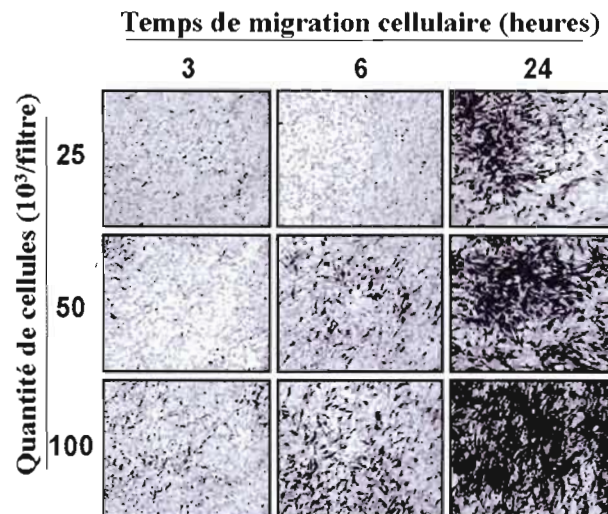


Figure 3.2 : Stimulation des voies des MAP Kinases avec divers facteurs de croissance

Les cellules U87 parentales (barres blanches) et U87 CD133⁺ (barres noires) ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 18 heures, puis elles ont été traitées ou non (Contrôle) avec divers facteur de croissance durant 5 minutes. Les concentrations des facteurs de croissance sont les suivantes : EGF et FGF (20 ng/mL), HGF, IGF et VEGF (50 ng/mL), LIF et NSF (10 ng/mL), SIP et LPA (1 μ M), NorÉ (10 μ M). Les lysats (20 μ g/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigée contre A) P-Raf et Raf, B) P-Mek et Mek, C) P-Erk et Erk, D) P-p38 et p38. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier les niveaux de phosphorylation de chaque protéine étudiée, exprimé en ratio (protéine phosphorylée/protéine non-phosphorylée). Pour chaque condition, les fractions traitées sont comparées à la fraction contrôle (Ctl). Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

A



B

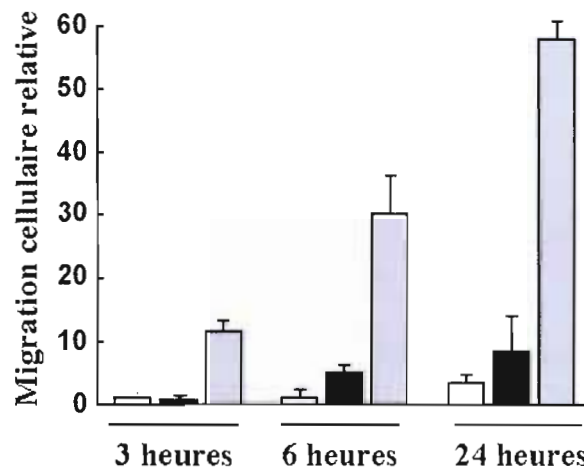


Figure 3.3 : Optimisation de la migration cellulaire des U87 parentales.

Les essais de migration cellulaire ont été effectués selon la technique des chambres de Boyden légèrement modifiée tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Trois différentes densités cellulaires des U87 parentales ont étéensemencées dans la chambre supérieure du filtre et incubées à 37°C pour 3, 6 et 24 heures. A) Des photographies représentatives de chaque condition sont montrées. B) Le nombre de cellules ayant migré a été déterminé en comptant au microscope les cellules sur la face inférieure du filtre. Les données représentent la moyenne du nombre de cellules par champs de microscope pour six champs différents de chaque condition. Les barres blanches représentent la densité 2.5×10^4 cellules, les barres noires 5.0×10^4 cellules et les grises 10.0×10^4 cellules. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

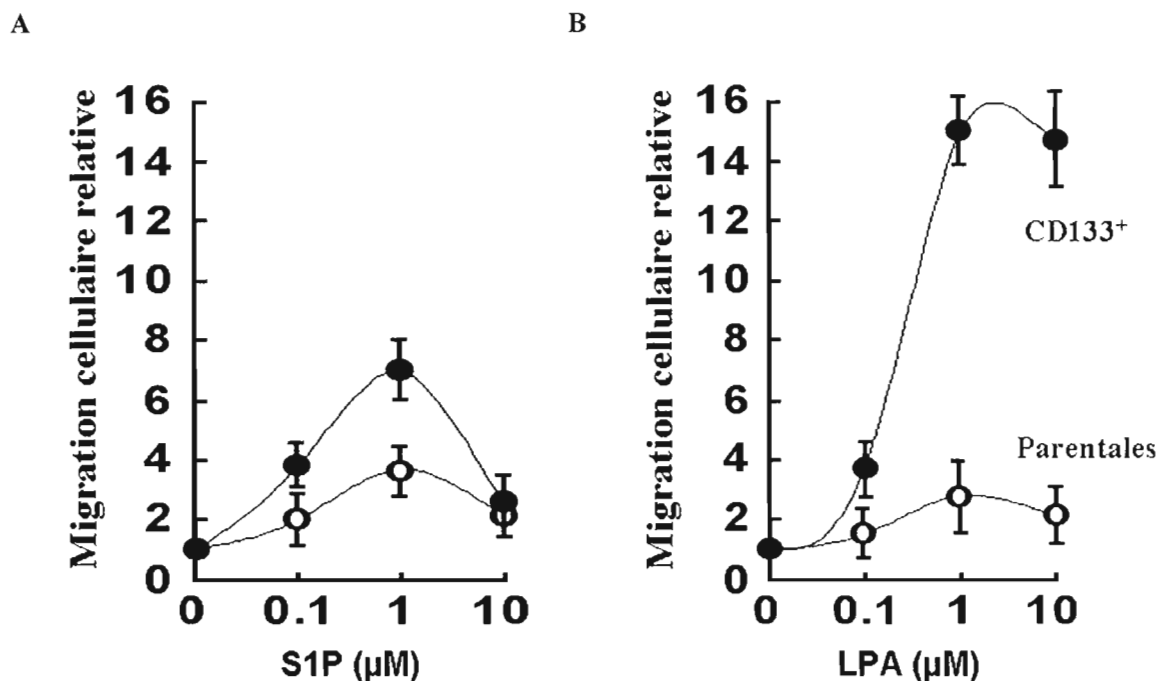


Figure 3.4 : Essais de migration cellulaire en présence de S1P et de LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

La migration (50×10^3 cellules/filtre, 6 heures de migration) des cellules U87 parentales (cercle blanc) et des U87 CD133⁺ (cercle noir) est effectuée selon la technique des chambres de Boyden légèrement modifiée telle que décrite dans la section Matériels et Méthodes, en présence de différentes concentrations A) de S1P et B) de LPA. La migration cellulaire a été quantifiée et exprimée comme x-fois l'induction de la migration de base (U87 Parentale : 35 ± 6 cellules/champs; U87 CD133⁺ : 52 ± 8 cellules/champs). Les données représentent la moyenne du nombre de cellules par champs de microscope pour six champs différents de chaque condition. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

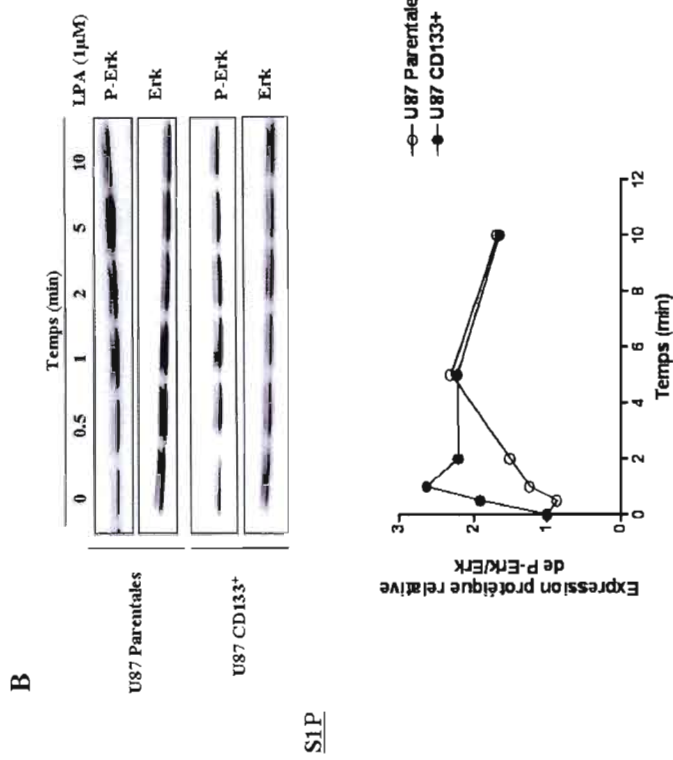
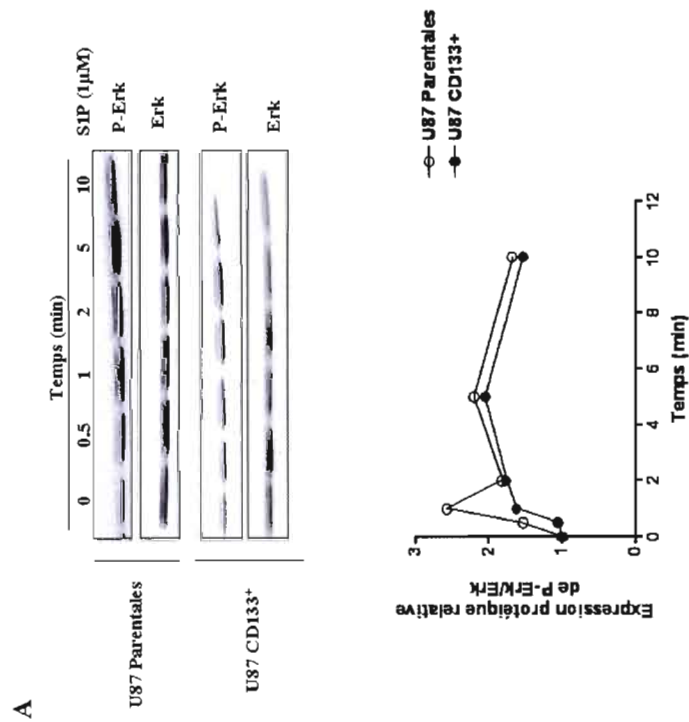
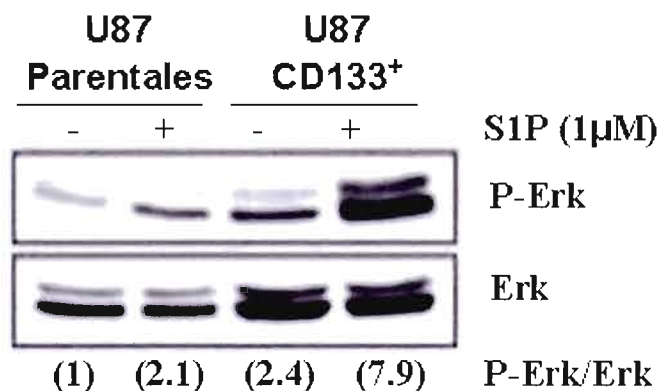


Figure 3.5 : Variation de P-Erk dans le temps suite à la stimulation au SIP et au LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

Les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 18 heures, puis elles ont été traitées A) au SIP (1 μ M) et B) au LPA (1 μ M) pendant 0.5, 1, 2, 5 et 10 minutes (0 minute est le contrôle). Les lysats (20 μ g/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre P-Erk et Erk. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, exprimé en ratio P-Erk/Erk. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

A



B

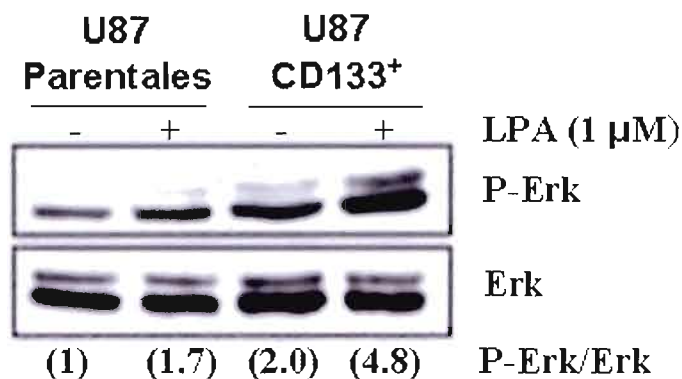


Figure 3.6 : La signalisation intracellulaire Erk est différenciellement modulée par le S1P et le LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

Les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 18 heures, puis elles ont été traitées (+) ou non (-) pendant 1 minute avec A) S1P (1 μ M) et pendant 2 minutes avec B) LPA (1 μ M). Les lysats (20 μ g/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre P-Erk et Erk. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, exprimé en ratio P-Erk/Erk (les ratios sont identifiés entre parenthèse pour chaque condition). Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

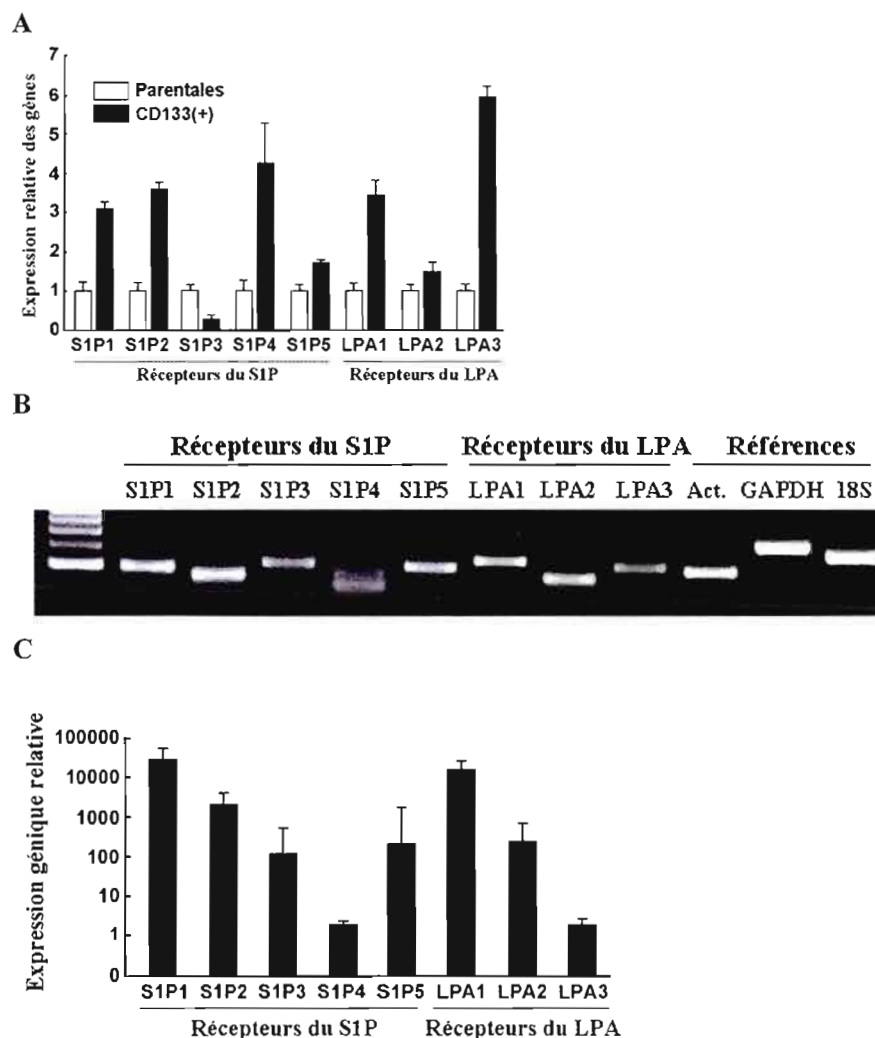


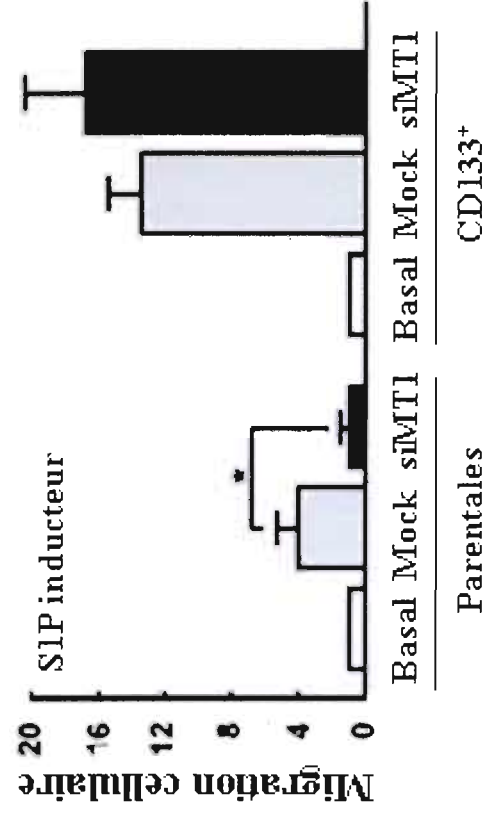
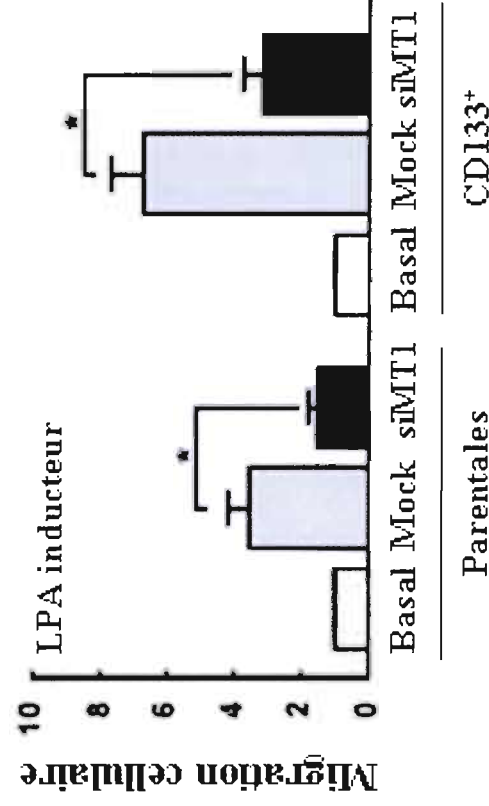
Figure 3.7 : Expression génique relative des récepteurs respectifs du S1P et du LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

L'extraction de l'ARN total à partir des cellules U87 parentales (barres blanches) et U87 CD133⁺ (barres noires) est exécutée afin de procéder à une RT-PCR quantitative pour relever le degré d'expression relatif des gènes des récepteurs du S1P (S1P1 à S1P5) et du LPA (LPA1 à LPA3). Les données des U87 CD133⁺ sont quantifiées par rapport à l'expression génique individuelle de chaque récepteur (S1P et LPA) des U87 parentales. Les données représentent trois expériences indépendantes. La valeur p (probability value), moindre que 0,05 seulement, est considérée significative et est indiquée par un astérisque (*). B) Validation par RT-PCR des produits d'amplification obtenus (Act, β -actine; GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; 18S, 18S ARN). C) L'extraction de l'ARN total à partir de 3 tumeurs intracrâniennes est exécutée afin de procéder à une RT-PCR quantitative pour relever le degré d'expression relatif des gènes des récepteurs du S1P (S1P1 à S1P5) et du LPA (LPA1 à LPA3). Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

A



B



C

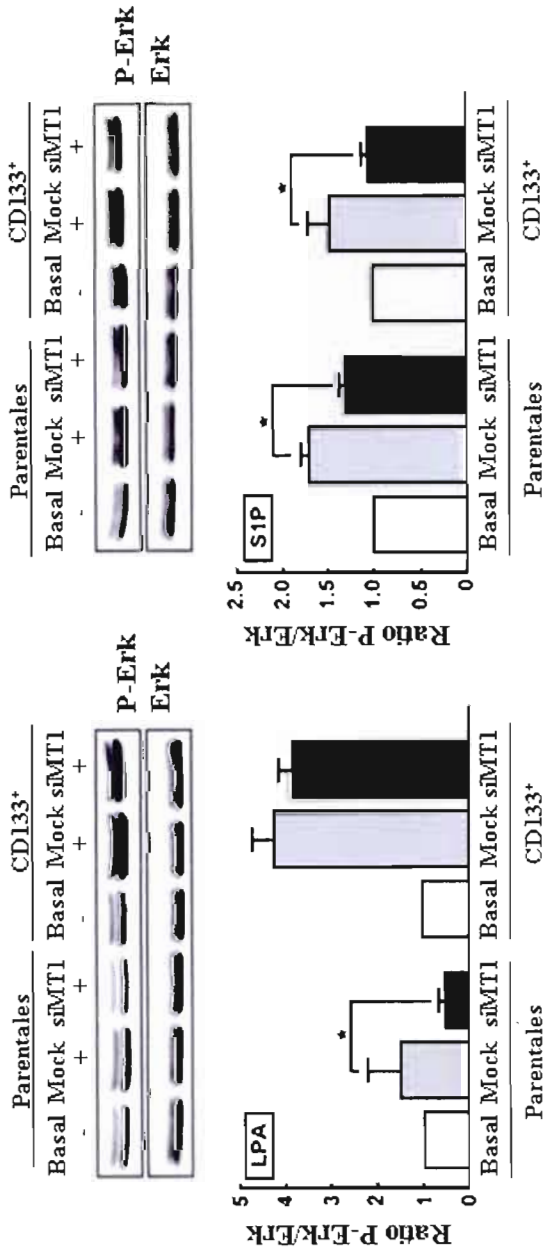


Figure 3.8 : Rôle de MT1-MMP dans la régulation différentielle de la migration cellulaire et de la phosphorylation de Erk induits par le SIP et le LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺
La transfection d'un siARN a été utilisée afin de réguler à la baisse l'expression de MT1-MMP dans les cellules U87 parentales et CD133⁺ tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. A) Afin de valider la transfection de MT1-MMP, les cellules ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum et en présence de concanavaline A. Le milieu conditionné de chaque condition a été récupéré 24 heures suivant la transfection. L'activation de la proMMP-2 a été évaluée par zymographie gélatine (20 µL/puits). B) Les essais de migration cellulaire en présence de SIP (à gauche) et de LPA (à droite) (1 µM) dans les U87 parentales et CD133⁺ ont été exécutés comme décrits dans la figure 3.4, dans les cellules Mock (barres grises) et dans les cellules transfectées siMT1-MMP (barres noires). Les résultats sont exprimés comme x-fois l'induction de la migration de base des cellules U87 parentales et CD133⁺, respectivement (barres blanches). C) Un immunobuvardage de type western blot a été réalisé afin de mesurer la phosphorylation de Erk dans ces mêmes cellules transfectées (siMT1) ou non (Mock) suite à la stimulation de 1 µM SIP (à droite) ou LPA (à gauche) (20 µg/ puits). Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, représenté ici comme un ratio P-Erk/Erk de trois expériences distinctes. La valeur p (probability value), moindre que 0,05 seulement, est considérée significative et est indiquée par un astérisque (*). Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

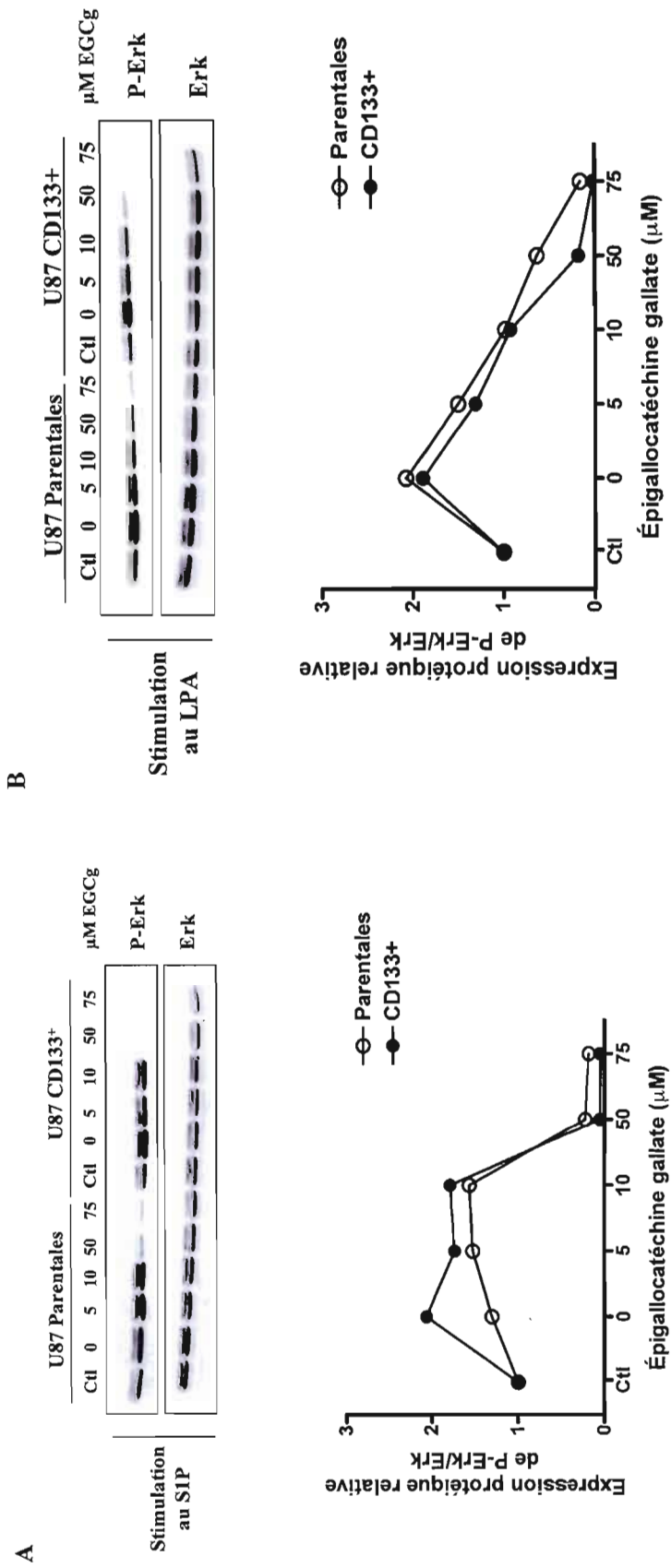


Figure 3.9 : Doses-réponses de l'EGCg en présence de S1P et de LPA dans les cellules U87 parentales et CD133⁺
Les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 18 heures, puis elles ont été traitées A) au S1P (1 μM) et B) au LPA (1 μM) pendant 5 minutes en présence ou non (Contrôle) de doses croissantes d'EGCg dont 5, 10, 50 et 75 μM. Les lysats (20 μg/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre P-Erk et Erk. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, exprimé en ratio P-Erk/Erk. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

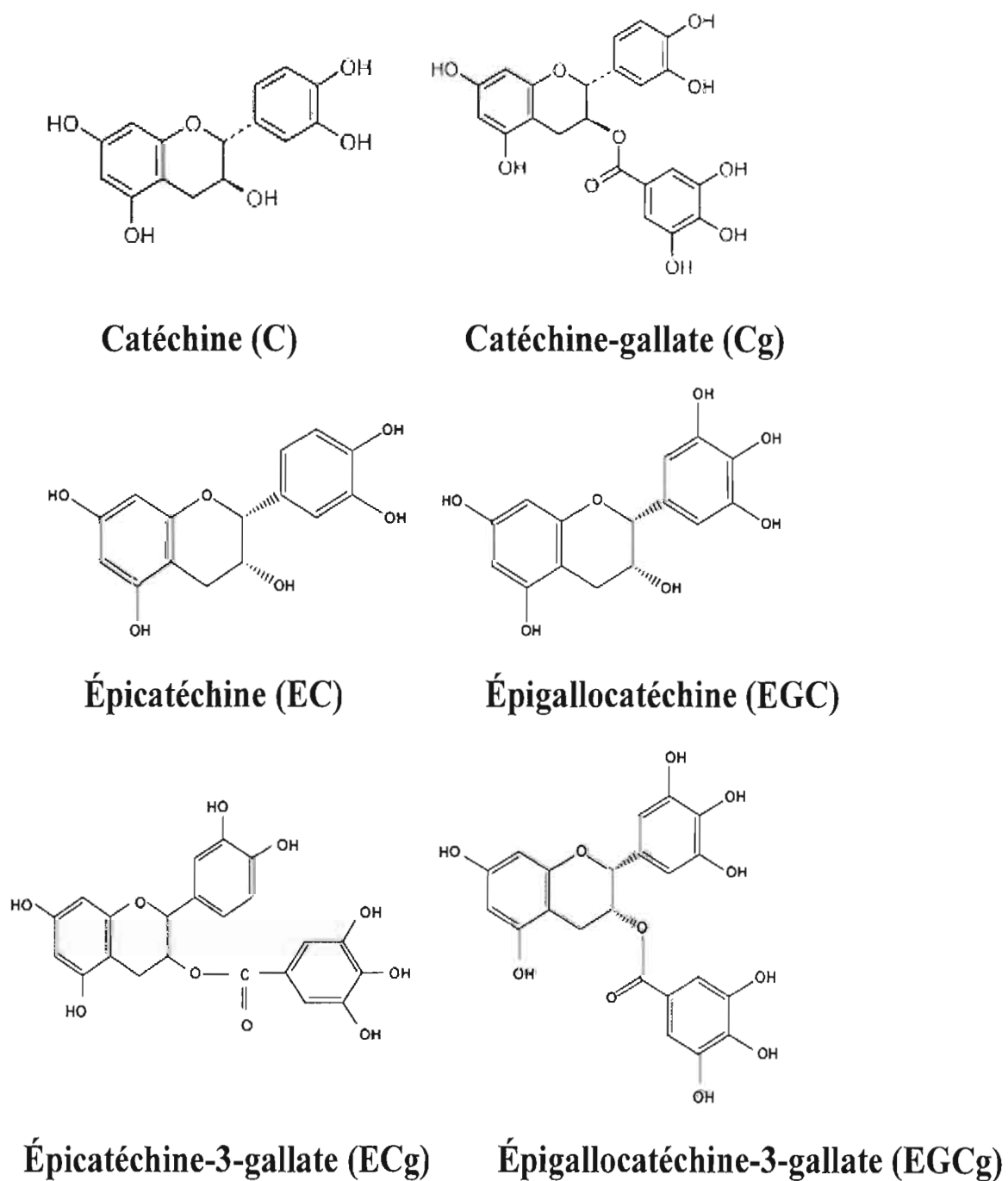


Figure 3.10 : Structure chimique des catéchines majoritaires du thé vert.
(Strobel et al., 2005; Khan et Mukhtar, 2008)

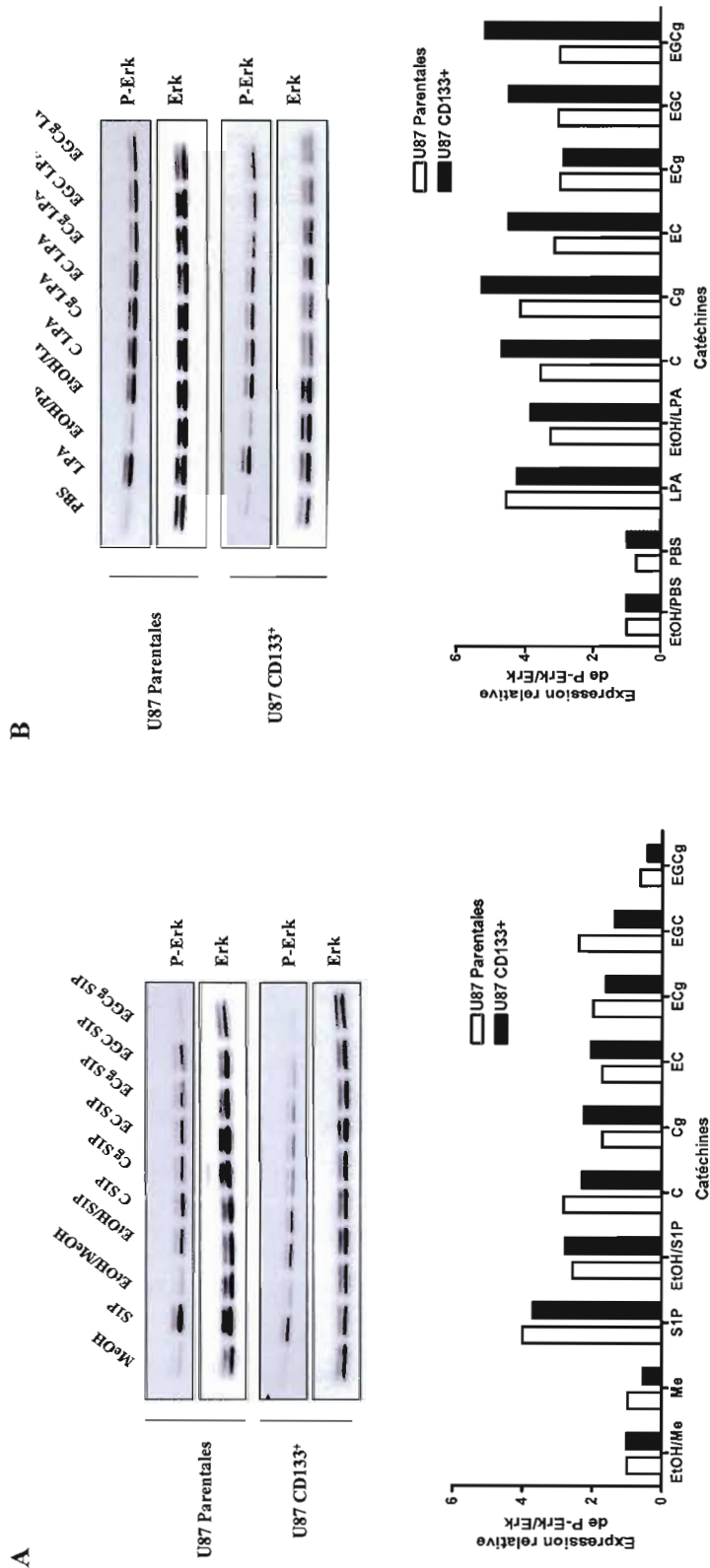
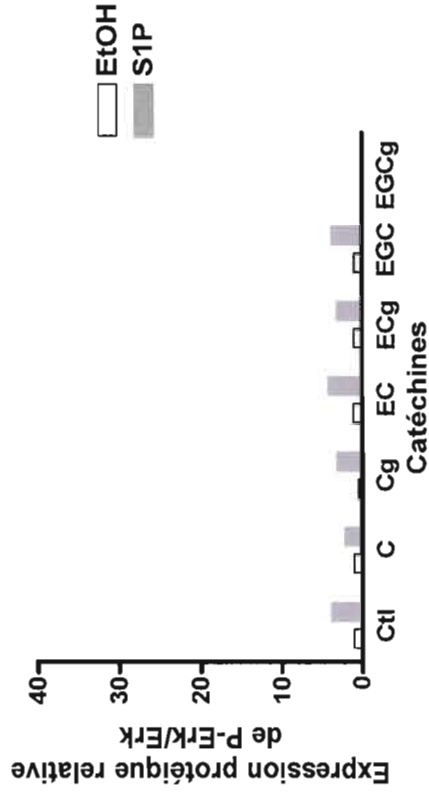
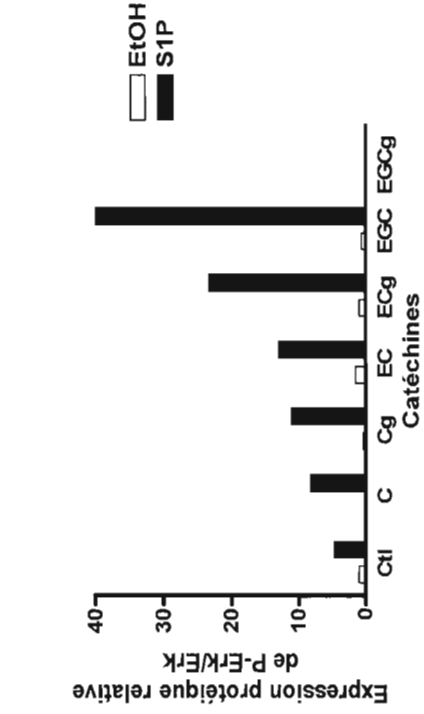
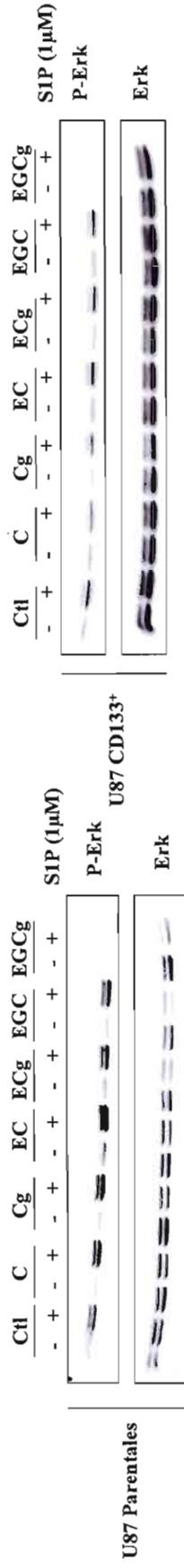


Figure 3.11 : Stimulation de la signalisation intracellulaire Erk par le SIP et le LPA en présence de diverses catéchines dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

Les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum en présence ou non des catéchines C, Cg, EC, ECG et ECGg (25 μ M) pendant 18 heures, puis elles ont été traitées A) au SIP (1 μ M) et B) au LPA (1 μ M) pendant 5 minutes. Le méthanol (MeOH, 0,4%) est le véhicule du SIP, le PBS 1% BSA (PBS) celui du LPA et l'éthanol (EtOH, 0,25%) celui des catéchines. Les lysats (20 μ g/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre P-Erk et Erk. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, exprimé en ratio P-Erk/Erk. Chaque condition est exprimé par rapport au contrôle EtOH/MeOH (pour le SIP) et EtOH/PBS (pour le LPA). Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

A



B

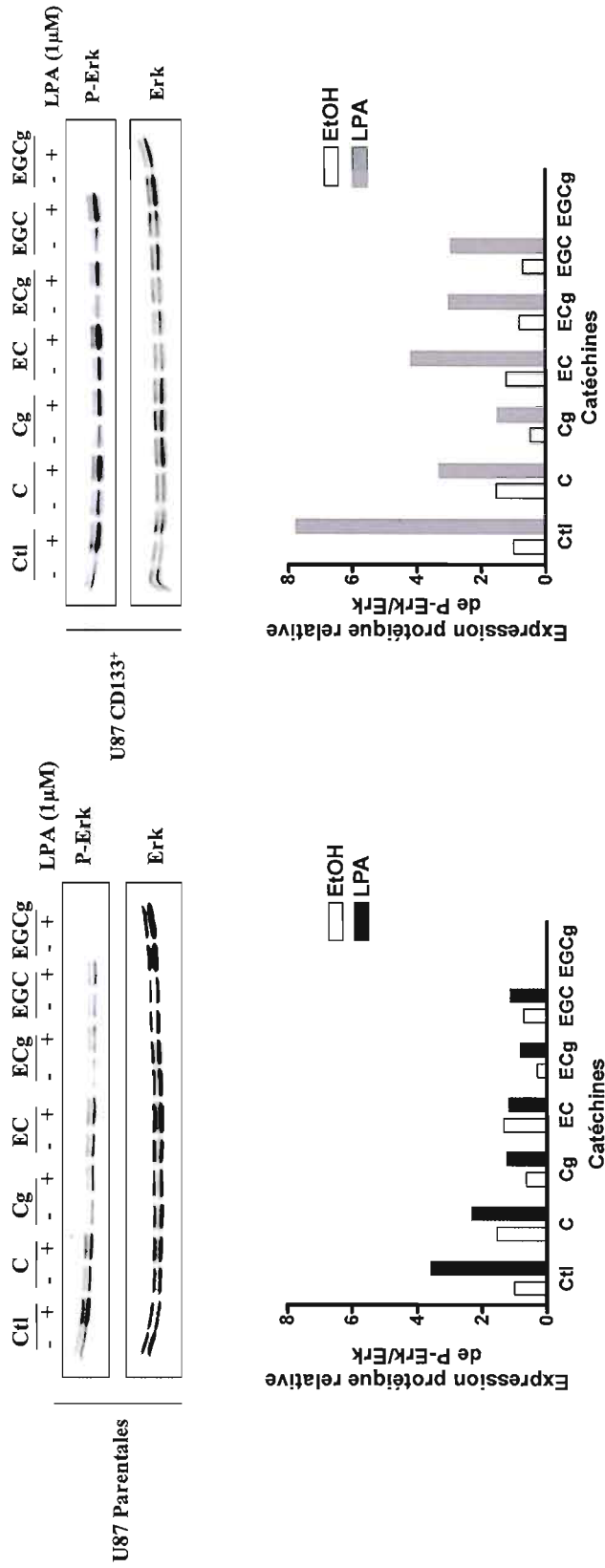


Figure 3.12 : Stimulation de la signalisation intracellulaire Erk par le SIP et le LPA en présence de diverses catéchines (4 heures) dans les cellules U87 parentales et CD133⁺
Les cellules U87 parentales (à gauche) et U87 CD133⁺ (à droite) ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 4 heures en présence ou non (EtOH) des catéchines C, Cg, EC, EGC et EGCg (25 µM), puis elles ont été traitées A) au SIP (1 µM) pendant 1 minute et B) au LPA (1 µM) pendant 2 minutes. Le SIP a été remplacé par du méthanol et le LPA par du PBS 1% BSA dans les conditions non-traitées (-). Les lysats (20 µg/puits) ont été déposés sur gel 12% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre P-Erk et Erk. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau de phosphorylation de la protéine Erk, exprimé en ratio P-Erk/Erk. Chaque condition est exprimée par rapport au contrôle (Ctl) sans stimulant. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

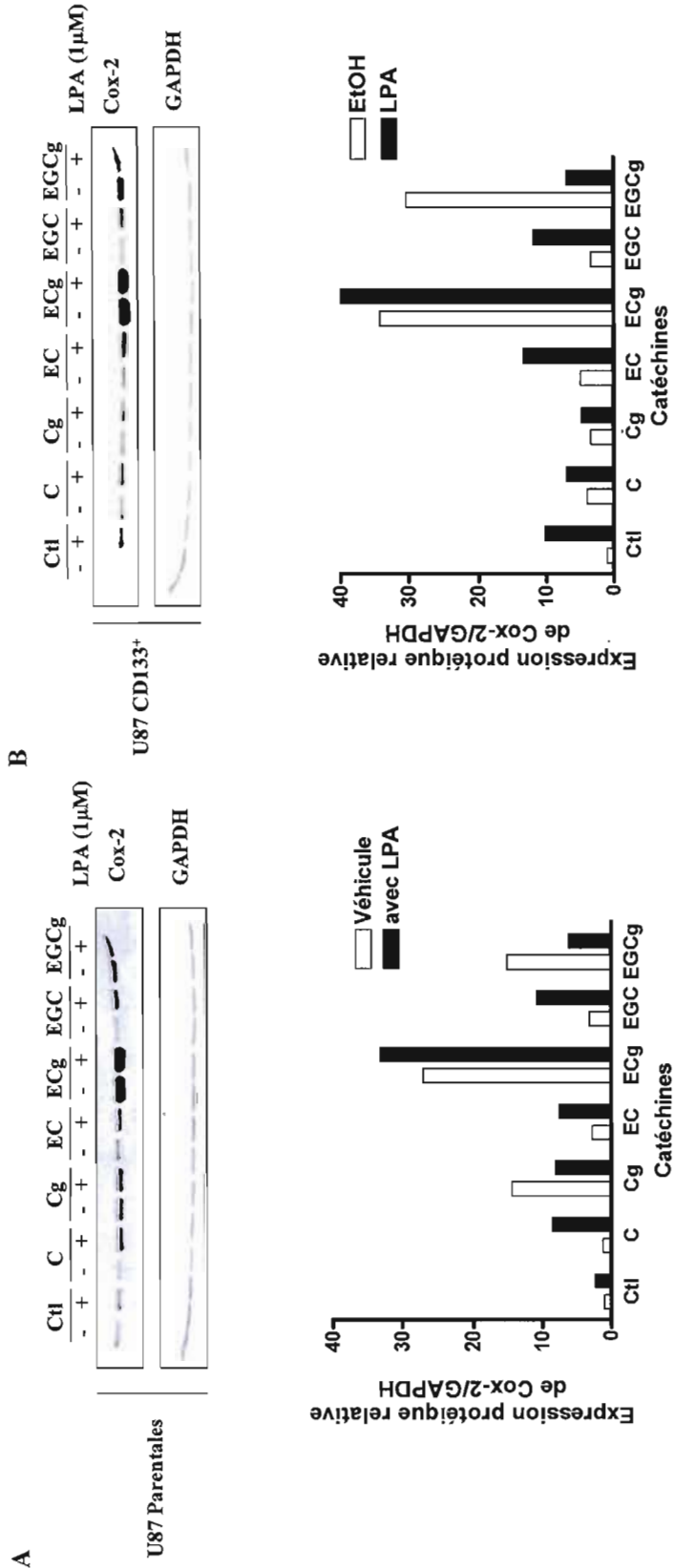
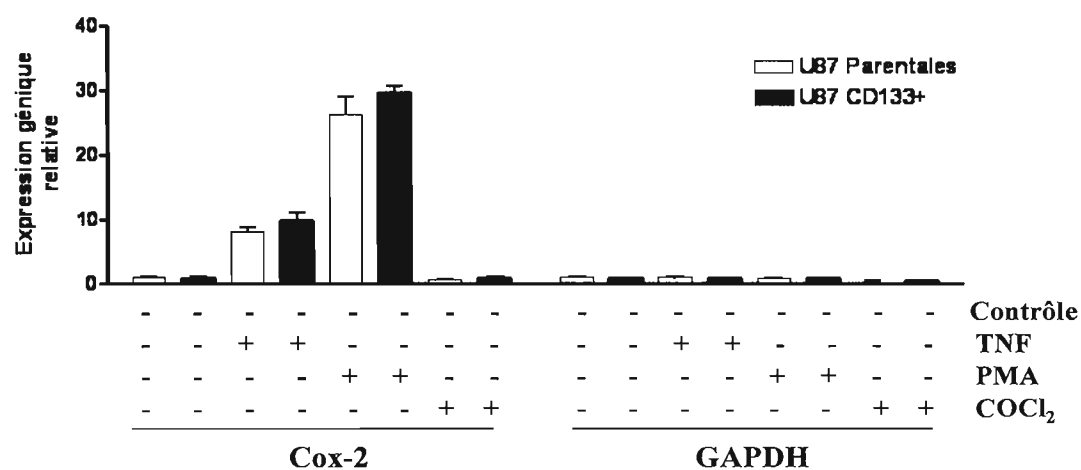


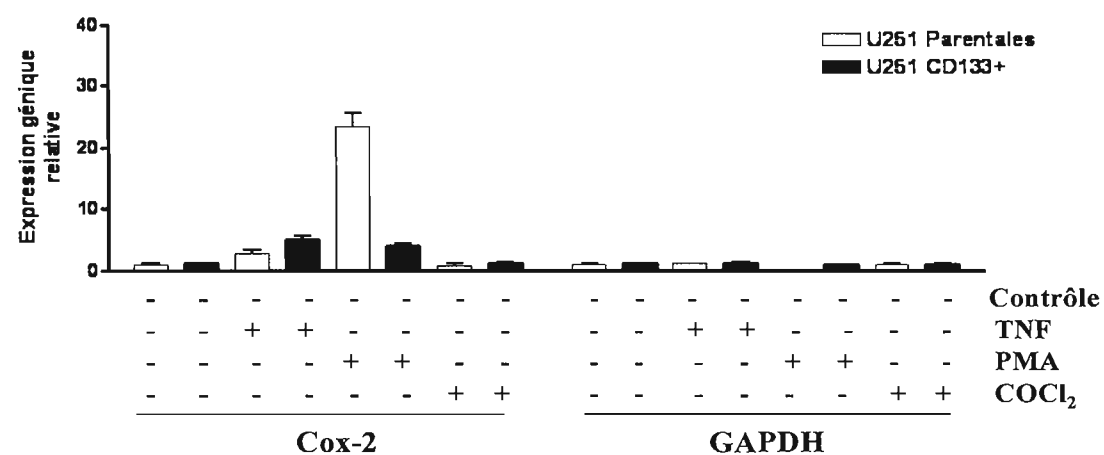
Figure 3.13 : Stimulation de la protéine Cox 2 par le S1P et le LPA en présence de diverses catéchines dans les cellules U87 parentales et CD133⁺

Une incubation dans du milieu de culture MEM sans sérum pendant 18 heures en présence ou non (EtOH) des catéchines C, Cg, EC, EGC, EGCg et EGCg (25 μ M) a été réalisée, dans les cellules A) U87 parentales et B) U87 CD133⁺ en plus d'être traitées au LPA (1 μ M). Le LPA a été remplacé par du PBS 1% BSA dans les conditions non-traitées (-). Les lysats (20 μ g/puits) ont été déposés sur gel 9% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre Cox 2 et GAPDH. Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau d'expression de la protéine Cox 2, exprimé en ratio Cox 2/GAPDH. Chaque condition est exprimée par rapport au contrôle sans LPA (Ctl). Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences

A



B



C

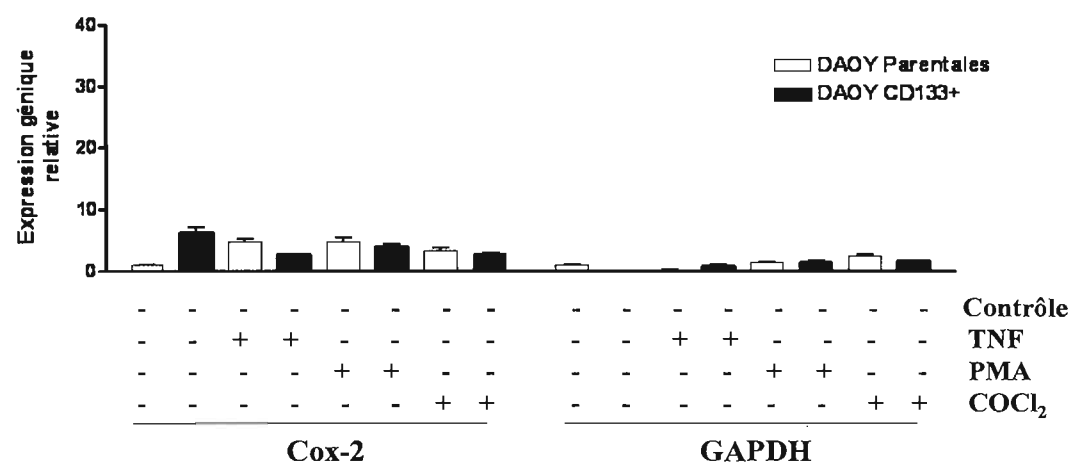


Figure 3.14: Expression génique de Cox 2 dans les cellules U87, U251 et DAOY parentales et CD133⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂

Les cellules parentales et CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 μ M) ou du CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. L'extraction de l'ARN total a été exécutée pour chaque condition afin d'évaluer le degré d'expression relatif du gène Cox 2. Les résultats sont normalisés sur le gène de référence β -actine. En A) les U87 parentales et CD133⁺, en B) les U251 parentales et CD133⁺, et en C) les DAOY parentales et CD133⁺. Les données sont exprimées par rapport à l'expression génique de Cox 2 de la condition contrôle des cellules parentales, respectives à chaque lignée cellulaire. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

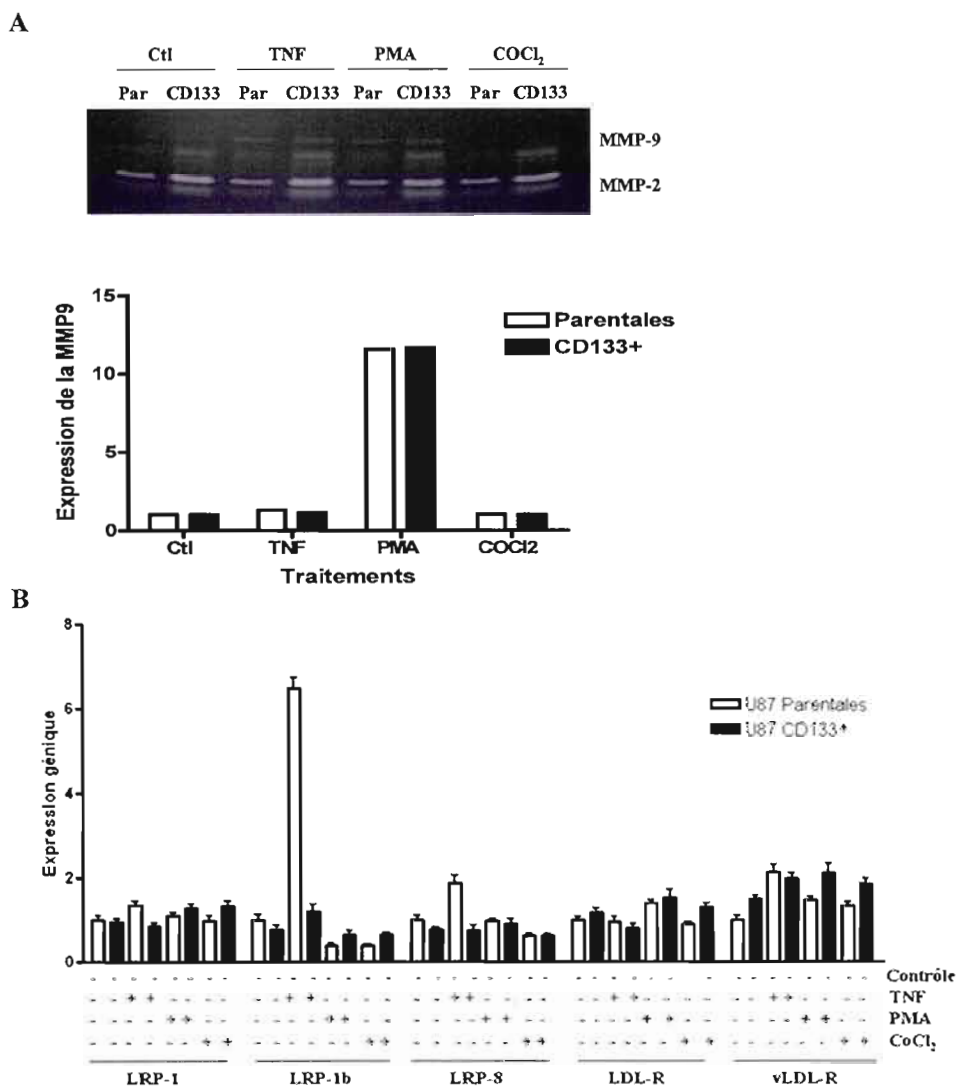


Figure 3.15 : Expression de la MMP-9 et expression génique des LRP dans les cellules U87 parentales et CD133⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂

Les cellules U87 parentales et U87 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 μ M) ou du CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. A) Les milieux conditionnés de chaque condition ont été récupérés et l'activation de la MMP-9 a été évaluée par zymographie gélatine (20 μ L/puits). La quantification des résultats est par rapport à la condition contrôle respective de chaque population cellulaire. B) L'extraction de l'ARN total a été exécutée pour chaque condition afin d'évaluer le degré d'expression relatif des gènes LRP dont LRP-1, LRP-1b, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. Les résultats sont normalisés sur les gènes de références β -actine et GAPDH respectifs pour chaque condition et sont exprimés par rapport à l'expression génique individuelle de chaque LRP de la condition contrôle des U87 parentales. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

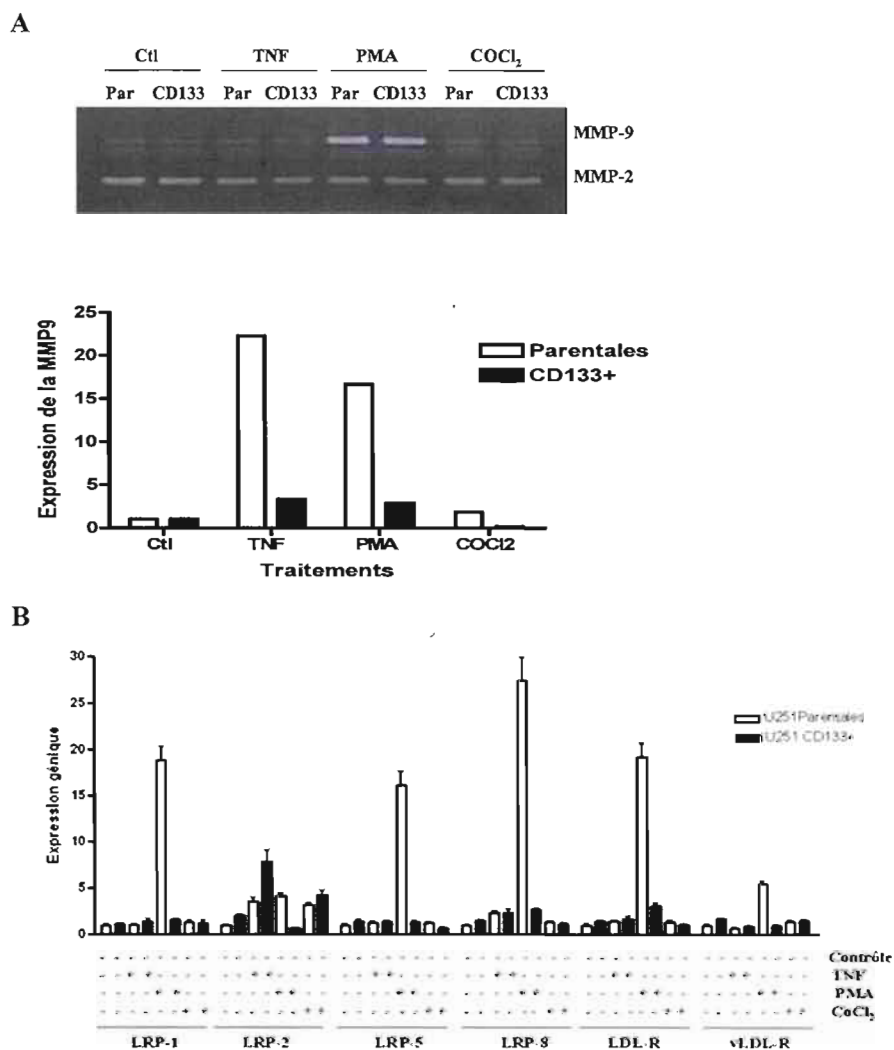


Figure 3.16 : Expression de la MMP-9 et expression génique des LRP dans les cellules U251 parentales et U251 CD133⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂

Les cellules U251 parentales et U251 CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 μ M) ou du CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. A) Les milieux conditionnés de chaque condition ont été récupérés et l'activation de la MMP-9 a été évaluée par zymographie gélatine (20 μ L/puits). La quantification des résultats est par rapport à la condition contrôle respective de chaque population cellulaire. B) L'extraction de l'ARN total a été exécutée pour chaque condition afin d'évaluer le degré d'expression relative des gènes LRP dont LRP-1, LRP-2, LRP-5, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. Les résultats sont normalisés sur les gènes de références β -actine et 18S respectifs pour chaque condition et sont exprimés par rapport à l'expression génique individuelle de chaque LRP de la condition contrôle des U251 parentales. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

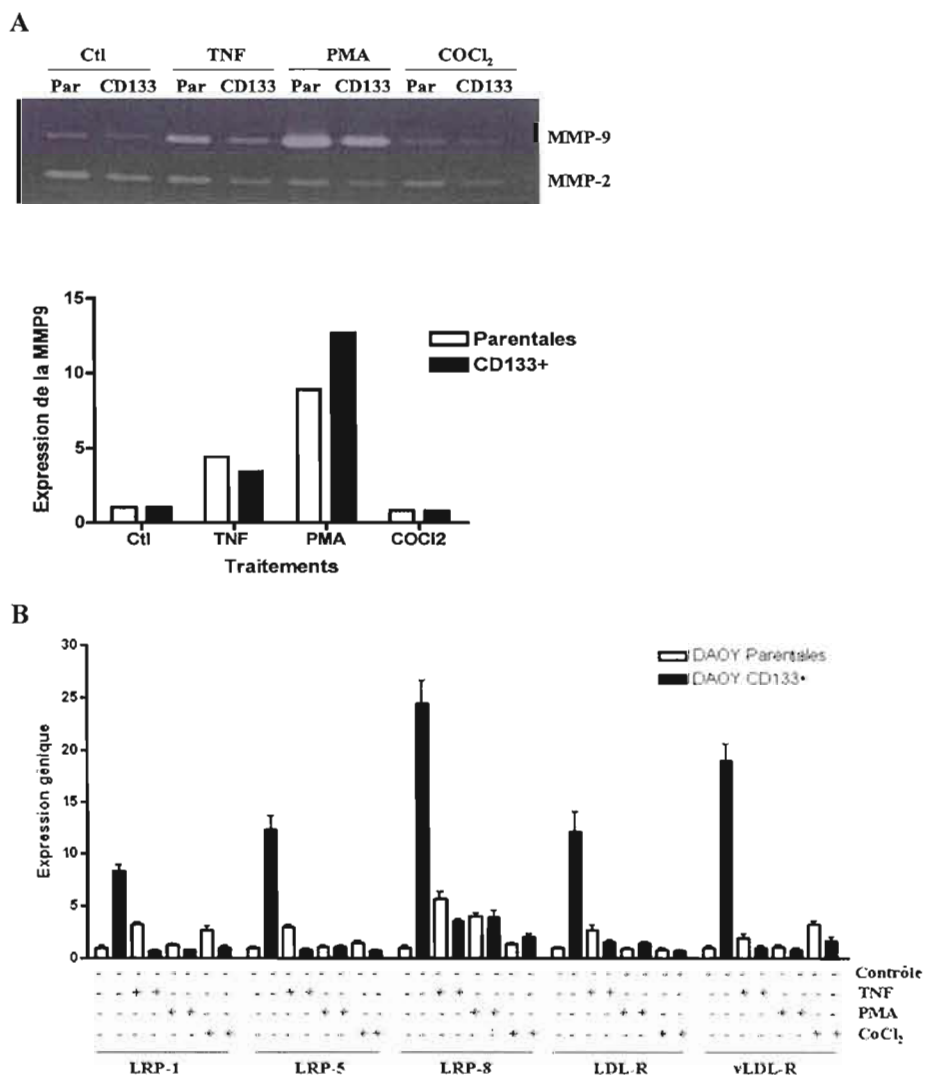


Figure 3.17 : Expression de la MMP-9 et expression génique des LRP dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺ suite aux traitements TNF, PMA et CoCl₂

Les cellules DAOY parentales et DAOY CD133⁺ ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 μ M) ou du CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. A) Les milieux conditionnés de chaque condition ont été récupérés et l'activation de la MMP-9 a été évaluée par zymographie gélatine (20 μ L/puits). La quantification des résultats est par rapport à la condition contrôle respective de chaque population cellulaire. B) L'extraction de l'ARN total a été exécutée pour chaque condition afin d'évaluer le degré d'expression relatif des gènes LRP dont LRP-1, LRP-5, LRP-8, LDL-R et vLDL-R. Les résultats sont normalisés sur les gènes de références β -actine et GAPDH respectifs pour chaque condition et sont exprimés par rapport à l'expression génique individuelle de chaque LRP de la condition contrôle des DAOY parentales. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

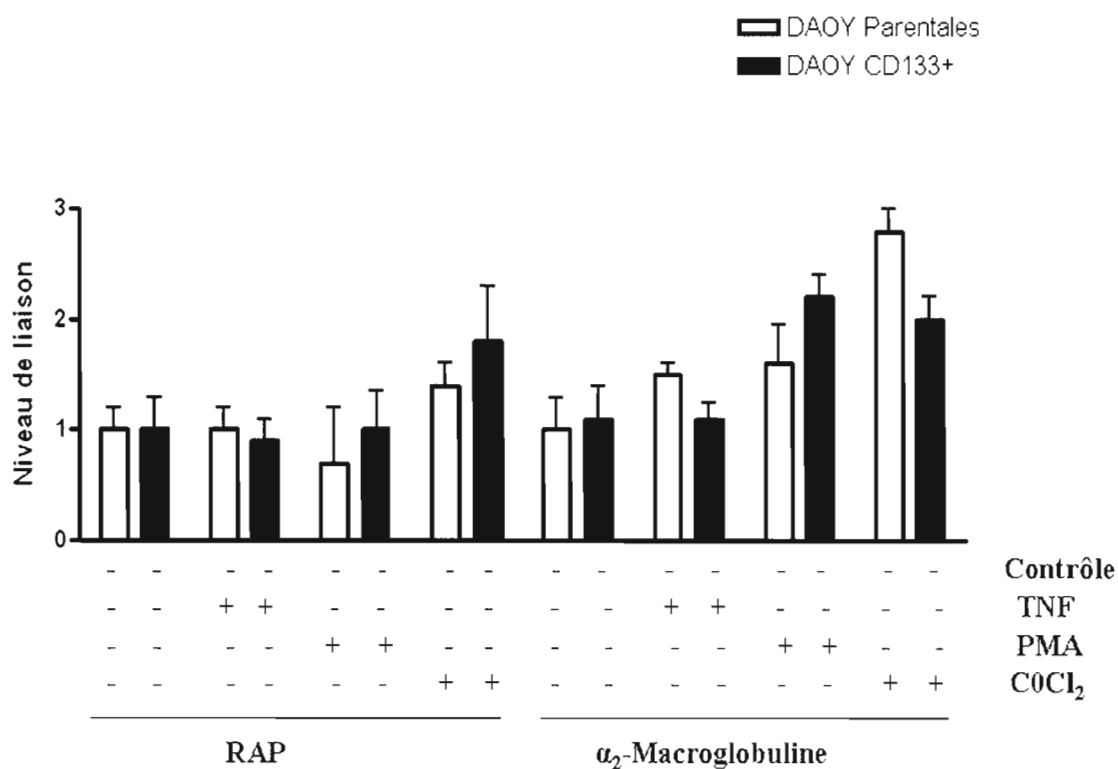
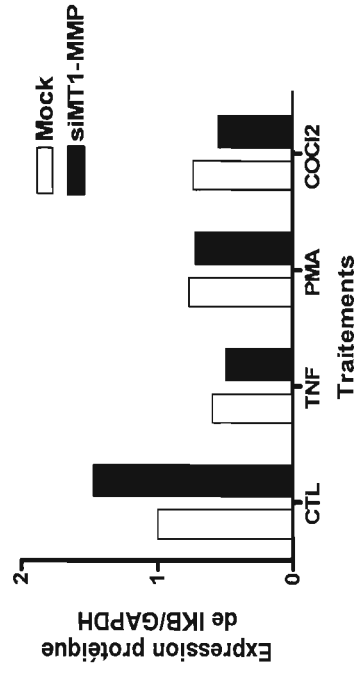
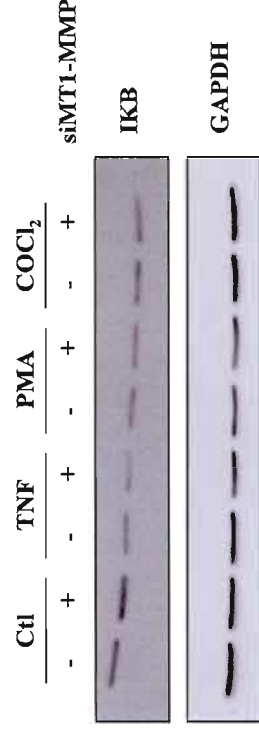
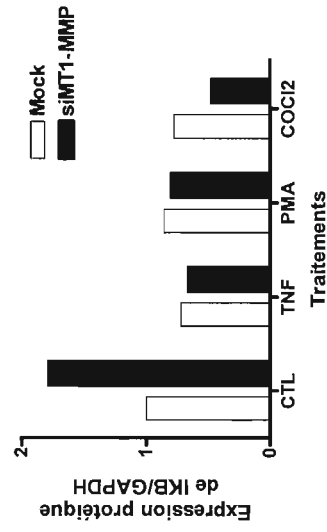
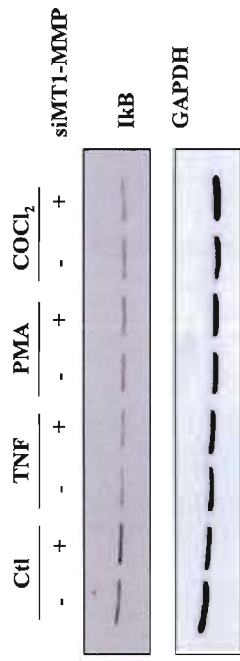


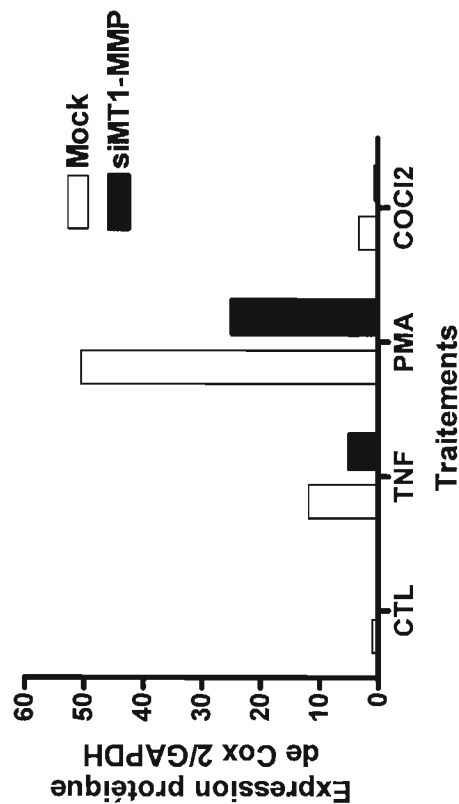
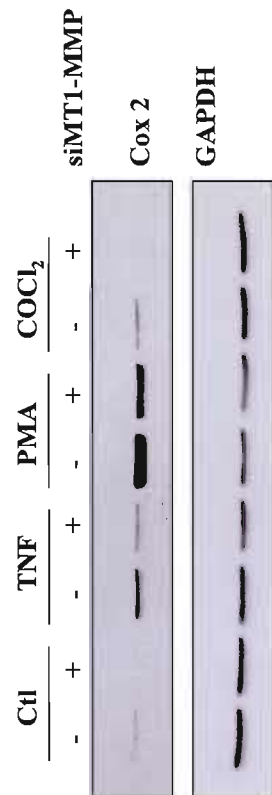
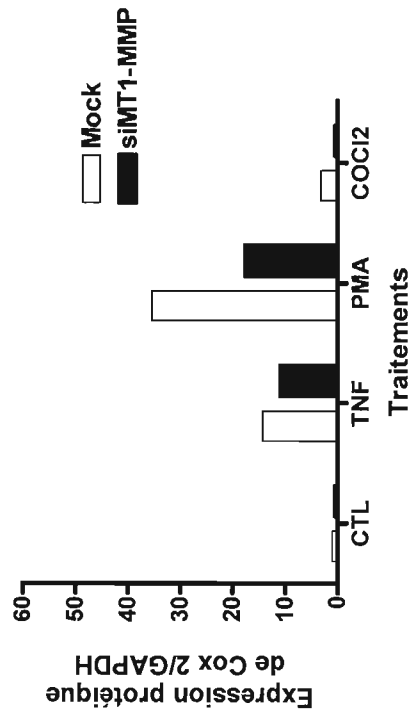
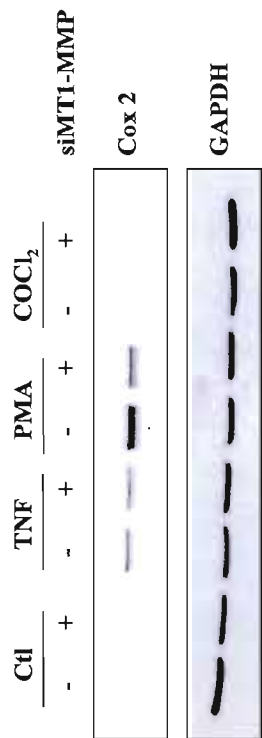
Figure 3.18 : Liaison différentielle à RAP et l' α_2 -Macroglobuline dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺

Les cellules parentales (barres blanches) et CD133⁺ (barres noires) ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum en présence ou non (Ctl) de TNF (10 ng/mL), de PMA (1 μ M) ou de CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. Par la suite, des essais de liaison à RAP et à l' α_2 -Macroglobuline radiomarqués à ¹²⁵I ont été exécutés comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

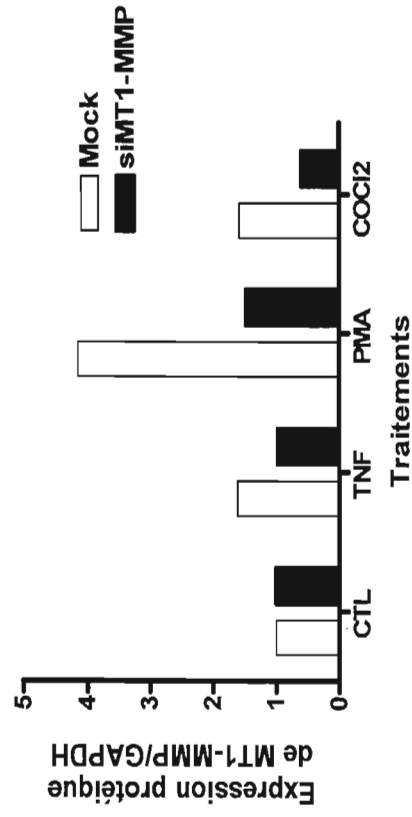
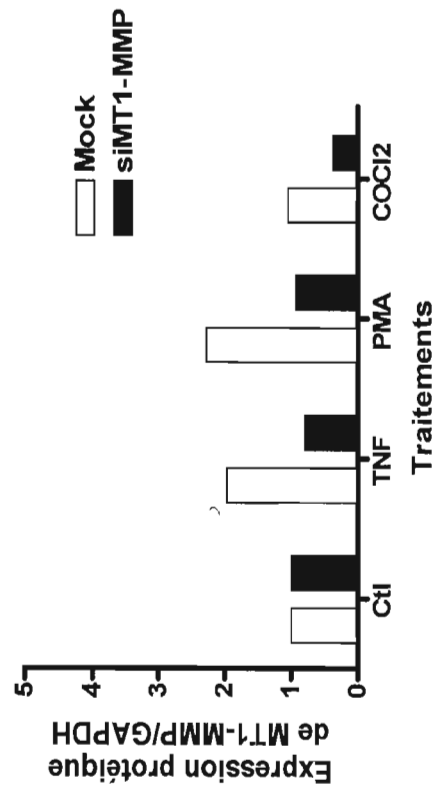
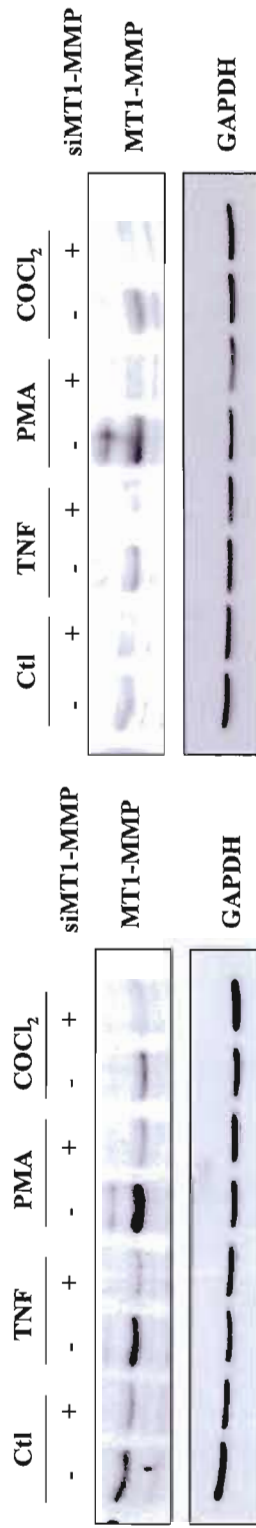
A



B



C



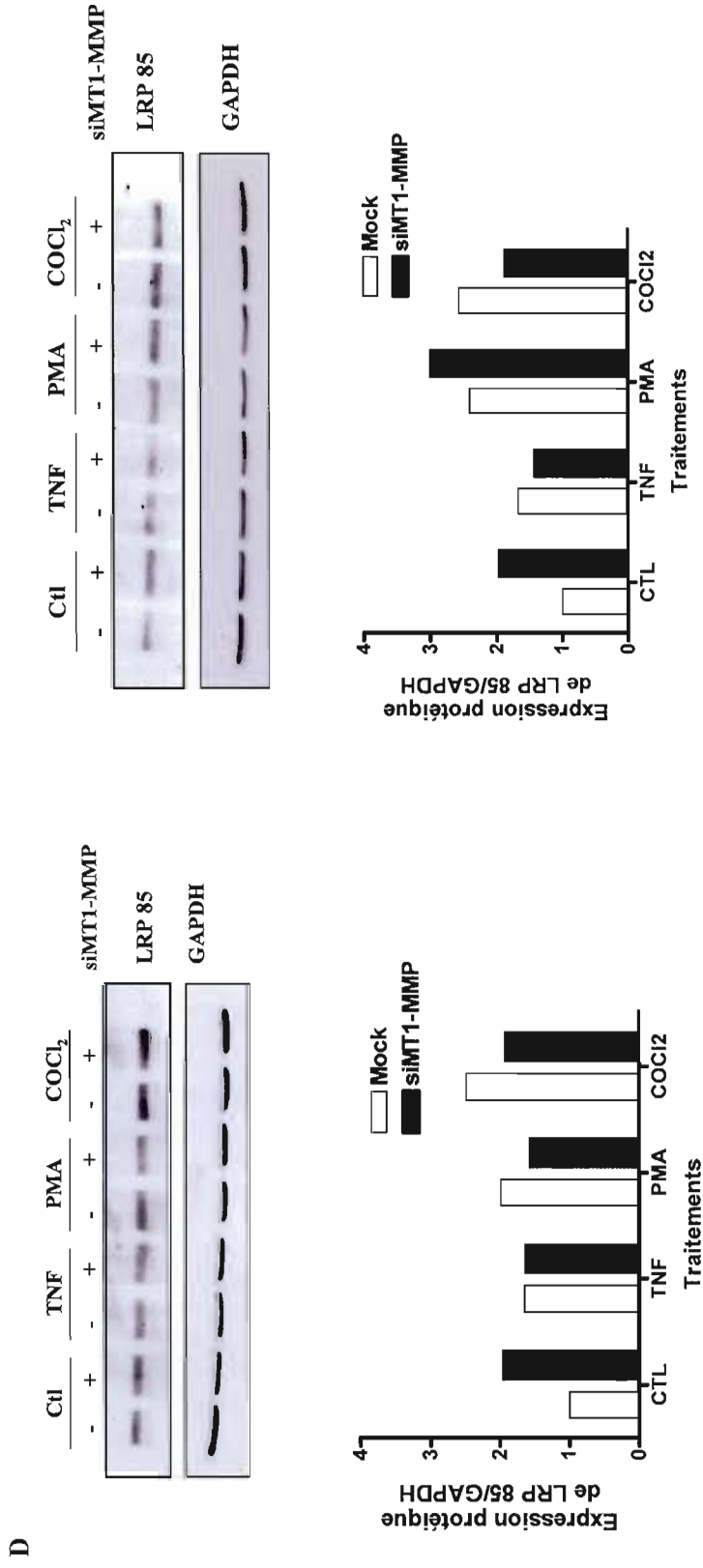


Figure 3.19 : Modulation par siMT1-MMP des protéines IκB, Cox 2, MT1-MMP et LRP 85 dans les DAOY parentales et CD133⁺
Les cellules parentales (à gauche) et CD133⁺ (à droite) ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum en présence de TNF (10 ng/mL), de PMA (1 μM) ou de CoCl₂ (100 μM) ou non (Ctl) pendant 18 heures. Les lysats (20 μg/puits) ont été déposés sur gel 9% (p/v) SDS-PAGE et immunodétectés avec l'anticorps dirigé contre A) IκB, B) Cox 2, C) MT1-MMP et D) LRP 85 (ainsi que GAPDH pour chacun). Des analyses densitométriques ont été effectuées afin de quantifier le niveau d'expression de chaque protéine, exprimé en ratio Protéine d'intérêt/GAPDH. Chaque condition est exprimée par rapport au contrôle sans stimulation (Ctl) des DAOY parentales. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences..

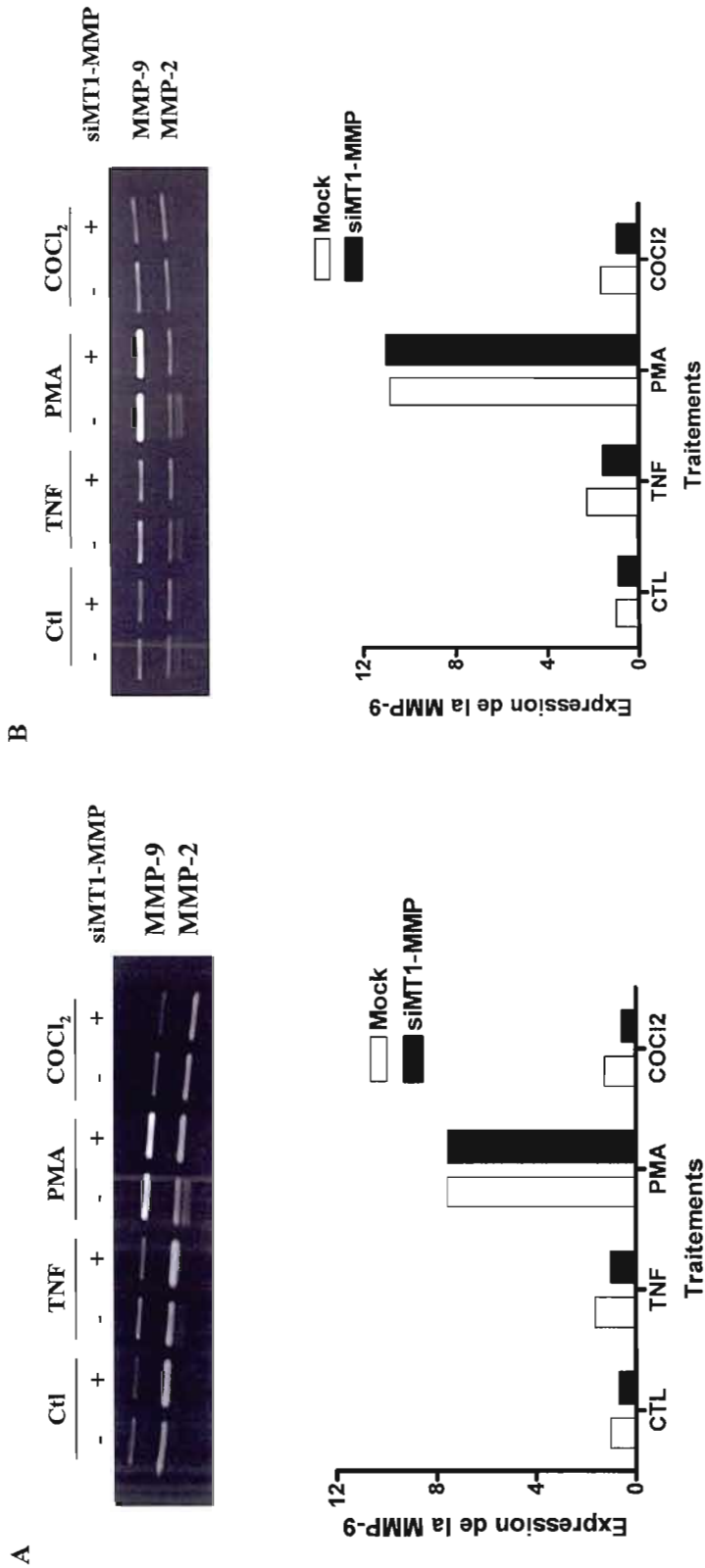
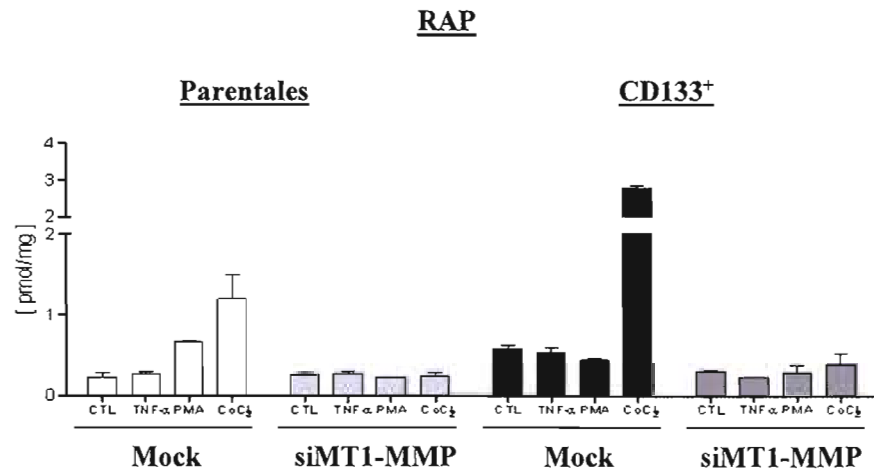


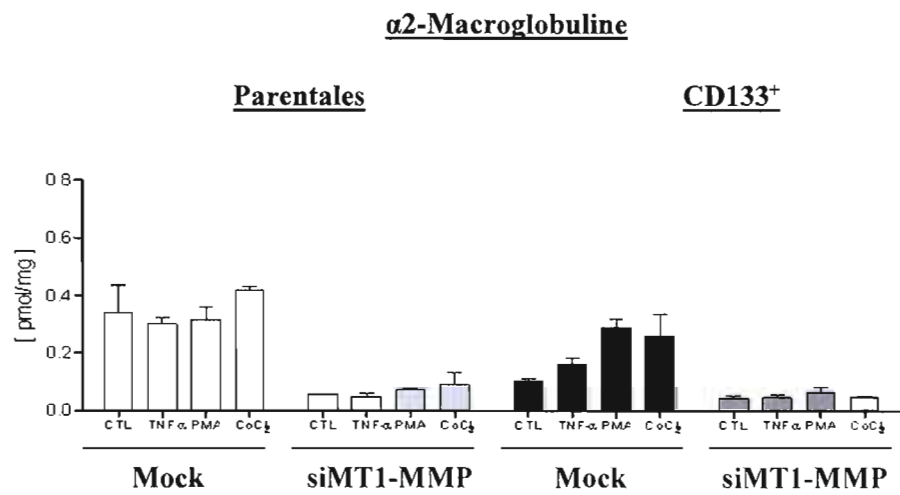
Figure 3.20 : Expression protéique de la MMP-9 dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺ transfectées et traitées au TNF, PMA et CoCl₂

La transfection d'un siARN a été utilisée afin de réguler à la baisse l'expression de MT1-MMP dans les cellules A) DAOY parentales et B) CD133⁺ tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Suite à la transfection, les cellules Mock et siMT1 de chaque population cellulaire ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 µM) ou du CoCl₂ (100 µM) pendant 18 heures. Les milieux conditionnés de chaque condition ont été récupérés et l'activation de la MMP-9 a été évaluée par zymographie gélatine (20 µL/puits). La quantification des résultats est par rapport à la condition contrôle (Ctl) respective de chaque population cellulaire. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences.

A



B



C

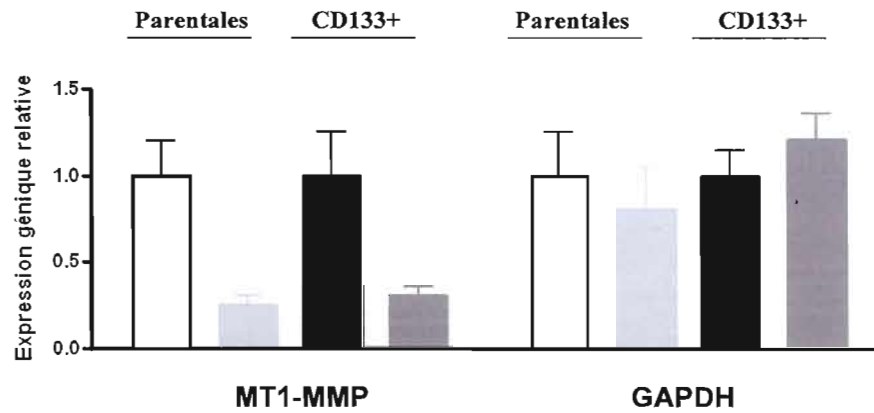


Figure 3.21 : Liaison différentielle à RAP et l' α_2 -Macroglobuline des cellules DAOY parentales et CD133⁺ transfectées avec siMT1-MMP

La transfection d'un siARN a été utilisée afin de réguler à la baisse l'expression de MT1-MMP dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺ tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les cellules DAOY parentales Mock sont représentées en blanc tandis que les siMT1-MMP sont en gris pâle et les cellules DAOY CD133⁺ Mock sont représentées en noir tandis que les siMT1-MMP sont en gris foncé. Suite à la transfection, les cellules Mock et siMT1 de chaque population cellulaire ont été incubées dans du milieu de culture MEM sans sérum contenant soit du TNF (10 ng/mL), du PMA (1 μ M) ou du CoCl₂ (100 μ M) pendant 18 heures. Par la suite, des essais de liaison à A) RAP et à B) l' α_2 -Macroglobuline radiomarqués à ¹²⁵[I] ont été exécutés comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. C) Validation de la transfection par RT-PCR quantitative, analyse de l'expression génique de MT1-MMP des cellules Mock et des cellules siMT1-MMP des DAOY parentales et CD133⁺, les résultats sont normalisés sur β -actine. Les résultats sont représentatifs de 2 à 3 expériences indépendantes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les CSC se définissent comme la sous-population de cellules composant la masse tumorale et dont la signature cellulaire s'apparente à celle des cellules souches neuronales incluant l'autorenouvellement, une quiescence ainsi qu'une résistance accrue à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Altaner, 2008). Il est donc avancé que les CSC pourraient être impliquées dans la récurrence du cancer et dans la résistance aux traitements. Le ciblage spécifique des CSC serait envisageable en thérapie, afin de freiner la progression tumorale ainsi que la récurrence des cancers. Une analyse moléculaire des CSC peut donc conduire à l'identification de nouvelles voies de signalisation importantes pour leur phénotype invasif et inflammatoire, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nos travaux ont été effectués en trois volets portant sur des processus spécifiques et essentiels à la progression tumorale. Le premier volet de notre recherche a porté sur le potentiel invasif des CSC en réponse à des facteurs plaquettaires circulants. Cette étude suggère la contribution de MT1-MMP au cours de la signalisation induite par le S1P. Le deuxième volet s'intéresse davantage à la modulation de l'expression de LRP1, de Cox-2 et d'I κ B dans un environnement inflammatoire, carcinogénique et hypoxique ; conditions qui miment l'environnement tumoral. Nos données expérimentales suggèrent une régulation différentielle des CSC au niveau de chaque condition engendrée, ce qui appuie une régulation différentielle du phénotype inflammatoire de ces cellules. Le troisième et dernier volet de notre recherche traite du marqueur CD133, de son expression et de la corrélation entre le phénotype CD133 et la prolifération tumorale. L'ensemble de nos recherches vise donc à identifier de nouvelles voies de signalisation et des partenaires moléculaires influençant le phénotype invasif et inflammatoire des CSC.

4.1. Potentiel invasif des CSC en réponse aux facteurs plaquettaires circulants

Les lysophospholipides sont des phospholipides simples qui ne sont pas seulement des métabolites de la synthèse des phospholipides de la membrane mais aussi des molécules bioactives de signalisation dans la progression tumorale (Murph et al., 2006). Maintenant, il est bien établi que le S1P et le LPA sont des molécules bioactives de signalisation associées au système immunitaire, cardiovasculaire, nerveux, reproducteur et respiratoire ainsi qu'au cancer (Pébay, Bonder et Pitson, 2007). Autant le S1P que le LPA stimulent la prolifération (Panetti, 2002) et la migration (Panetti, Nowlen et Mosher, 2000) des cellules endothéliales ce qui promeut l'angiogenèse. De récentes évidences suggèrent que les lysophospholipides, particulièrement le S1P et le LPA, détiennent un rôle considérable dans la régulation de plusieurs aspects des cellules souches embryonnaires et adultes incluant la prolifération, la survie, la différenciation ainsi que la migration de ces cellules (Pébay, Bonder et Pitson, 2007).

Même si les lysophospholipides jouent probablement un rôle crucial dans la mobilisation et le déplacement des cellules souches, leur impact sur le phénotype d'invasion et d'infiltration des CSC reste obscur. Cette étude démontre que les cellules U87 CD133⁺ réagissent davantage à la présence des lysophospholipides que les cellules U87 parentales, ce qui peut s'expliquer par une expression différentielle des récepteurs du S1P et du LPA. Les récepteurs S1P1, S1P2 et LPA1, dont l'expression est augmentée autant au niveau des tumeurs intracrâniennes expérimentales que dans les cellules U87 CD133⁺, peuvent potentiellement expliquer la réaction plus prononcée des cellules U87 CD133⁺ face au S1P et au LPA. Par contre, on retrouve également une expression accrue des récepteurs S1P4 et LPA3 dans les cellules U87 CD133⁺, mais elle n'est pas remarquée dans les tumeurs intracrâniennes ce qui suggère une sélection éventuelle de l'expression des récepteurs respectifs des lysophospholipides *in vivo*. De plus, la concentration physiologique du S1P (~0.2 à 0,5 μ M) ou du LPA (~1 à 10 μ M) (Panetti, 2002) peut contribuer au phénotype d'infiltration des cellules U87 CD133⁺ associées au développement d'une tumeur cérébrale. Les résultats observés le suggèrent car on observe une réponse migratoire maximale à une concentration de 1 μ M autant pour le S1P que le LPA.

La réponse plus prononcée des cellules U87 CD133⁺ en présence de S1P et de LPA des cellules U87 CD133⁺ est à une concentration de 1 μ M suggérant que contribue

4.1.1. Contribution de MT1-MMP à l'axe de signalisation MT1-MMP/S1P des CSC

Plusieurs études suggèrent que la sous-famille des MT-MMPs, plus particulièrement la MT1-MMP, semble avoir une importance particulière dans l'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases (Sato, Okada et Seiki, 1997). Outre son rôle bien établi dans l'activation de la proMMP-2 et de son activité intrinsèque de protéolyse des molécules de la matrice extracellulaire, le domaine cytoplasmique de MT1-MMP a été associé à des activités de signalisation. De nouvelles fonctions de MT1-MMP ont récemment été démontrées, incluant l'activation de la voie TGF β /Alk5 menant à l'angiogenèse via la PGE₂ (Alfranca et al., 2008), la mobilisation du calcium intracellulaire (Fortier et al., 2008), la régulation des signaux pro-survie et pro-apoptose (Belkaid et al., 2007) et la radio-résistance des cellules gliales (Wild-Bode et al., 2001). Une étude de notre laboratoire a également démontré un axe de signalisation MT1-MMP/Cox-2 dans des cellules dérivées de glioblastome (Annabi et al., 2009). D'autre part, nous démontrons que les fonctions de MT1-MMP sont requises dans le mécanisme qui régule la signalisation induite par le S1P.

Puisque l'implication de MT1-MMP au cours de la progression tumorale, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être mises en place afin de cibler directement les fonctions de MT1-MMP ou sa signalisation associée. D'ailleurs, une nouvelle approche a déjà été conçue, laquelle implique l'utilisation d'ARN interférent dans le but d'inhiber l'expression de MT1-MMP (Arroyo et al., 2007). L'interférence provoquée dans l'expression de l'ARN de MT1-MMP a démontré de bons résultats, dont une diminution de la migration tumorale et de l'invasion (Bartolomé et al., 2006; Ueda et al., 2003). Dans notre étude, l'inhibition de l'expression de MT1-MMP, spécifiquement, entrave la réponse au S1P mais pas de celle du LPA qui demeure inchangée dans les CSC CD133⁺.

4.1.2. Ciblage pharmacologique des voies de signalisation par les catéchines

Comme les CSC CD133⁺ sont caractérisées par une résistance intrinsèque aux agents chimiothérapeutiques (Soltysova et al., 2005; Liu et al., 2006), l'étude s'est poursuivie avec l'utilisation de molécules naturelles afin d'étudier de possibles effets entre les cellules U87

parentales et les cellules U87 CD133⁺. Plusieurs études ont démontré, sur des modèles animaux, que l'EGCg inhibe la carcinogenèse à tous les stades incluant l'initiation, la promotion et la progression (Chung et al., 2003). Les multiples facettes de l'EGCg dans l'inhibition du processus tumorigène sont attribuables à la combinaison des effets antioxydatifs, antiprolifératifs et proapoptotiques de celui-ci (Gouni-Berthold et Sachinidis, 2004). L'EGCg a également la capacité d'inhiber le processus d'angiogenèse tumoral, la formation de métastase et l'invasion dans des modèles animaux (Fassina et al., 2004 ; Jung et Ellis, 2001 ; Garbisa et al., 2001). En effet, l'EGCg diminue la liaison entre le VEGF et son récepteur (Lamy, Gingras et Béliveau, 2002) et il affecte également l'activité des MMPs (Khan et al., 2006).

Parmi les six catéchines testées, l'EGCg est celle dont les fonctions sont le mieux documentées. Plusieurs évidences soutiennent que l'EGCg inhibe P-Erk (Maeda-Yamamoto et al., 2003 ; Chung et al., 2001). Paradoxalement, d'autres études soutiennent plutôt l'inverse (Kim et al., 2004). Cette ambiguïté peut probablement s'expliquer par l'auto-oxydation de l'EGCg (Yang et al., 2006). Cette catéchine n'est pas stable dans le milieu cellulaire, elle a une demi-vie de 30 minutes. Des molécules hautement réactives telles que le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde sont alors formées. Il a été démontré que le traitement à l'H₂O₂ entraîne la phosphorylation de Erk1/2, JNK et p38 dans les cellules kératinocytes épidermiques humaines (Liu et al., 2002). Plusieurs activités biologiques attribuées à l'EGCg peuvent être causées par ces espèces réactives oxygénées. Donc, l'inhibition observée n'est pas hors de tout doute attribuable à l'EGCg. Les différents résultats recueillis, au niveau du traitement combiné de 18 heures ou du prétraitement de 4 heures, peuvent s'expliquer par une accumulation d'espèces réactives oxygénées qui affectent la signalisation intracellulaire de la cellule. Des résultats semblables, dont l'augmentation de P-Erk par l'EGCg, ont été rapportés sur l'expression protéique de P-Erk dans la même lignée cellulaire testée de notre étude, les cellules U87 dérivées de glioblastome (Kim et al., 2004).

On retrouve le même dilemme au niveau des effets escomptés sur Cox-2. Plusieurs publications ont décrit un effet inhibiteur de l'EGCg sur la régulation élevée de Cox 2 induite

par exemple, par le PMA (Kundu et al., 2003) ou par l'interleukine-1 β (Ahmed et al., 2002), ce qui confère à l'EGCg une activité anti-inflammatoire. D'autres, stipulent une augmentation de Cox-2 à la suite de la stimulation de l'EGCg. C'est le cas dans la lignée de macrophages Raw 264.7 (Park et al., 2001), dans les chondrocytes humains (Ahmed et al., 2002) ainsi que dans la lignée cellulaire U87 de glioblastome (Kim et al., 2004). La conclusion que l'EGCg induit la protéine Cox-2 peut sembler paradoxale, car les actions de l'EGCg et de Cox-2 sont généralement vues comme bénéfiques et néfastes, respectivement (Claria, 2003 ; Wu, 1998). L'induction de l'expression de Cox-2 peut représenter un nouveau mécanisme par lequel l'EGCg mène ses diverses actions dans le système nerveux central.

4.2. Modulation de l'expression de LRP1, de Cox-2 et d'I κ B dans un environnement inflammatoire, carcinogénique et hypoxique

Vu sa capacité à interagir avec divers ligands à la surface cellulaire, LRP représente un relais stratégique dans le contrôle du comportement cellulaire. En effet, LRP ne contrôle pas seulement le niveau péricellulaire de divers facteurs de croissance et de protéases, mais il est aussi impliqué dans la signalisation cellulaire qui régule la migration, la survie et la prolifération cellulaire (Emonard et al., 2005). L'activité d'endocytose de plusieurs molécules qui exercent des effets délétères lors de la progression tumorale a longtemps confiné LRP au rôle potentiel de suppresseur de tumeur (Langlois et al., 2009). Des travaux récents, ainsi que les données de notre étude, ont permis de tempérer cette description et nous amènent à proposer un modèle global dans lequel LRP apparaît comme un récepteur versatile.

4.2.1. Modulation de l'expression des récepteurs LRPs dans le développement

L'expression différentielle des LRPs observée au sein des CSC CD133⁺ des trois lignées cellulaires triées appuie l'hypothèse du rôle versatile de ces récepteurs dans la progression tumorale. En effet, les CSC CD133⁺ des lignées dérivées de glioblastomes, les U87 et les U251, démontrent des niveaux d'expression similaire à leurs populations parentales respectives analysées. À l'opposé, on remarque une régulation différentielle des LRPs dans les CSC CD133⁺ dérivées de méduloblastome. L'ensemble des LRPs analysés est exprimé à la hausse dans les DAOY CD133⁺. Donc, l'analyse des CSC CD133⁺ de trois lignées cellulaires différentes démontre une régulation différentielle dans l'expression des LRPs au

cours du développement. Malgré leurs différences biologiques et cliniques, le traitement des tumeurs malignes de l'enfant et de l'adulte semble être convergents. Malheureusement, la toxicité associée aux traitements conventionnels entraîne des taux élevés de mortalité et de morbidité ainsi que des séquelles neurologiques importantes chez l'enfant (Rossi et al., 2008). Le développement du système nerveux consiste à la prolifération extensive d'un petit nombre de cellules précurseurs multipotentes afin de générer les cellules neuronales et gliales qui forment le cerveau adulte. L'élucidation des mécanismes qui contrôlent la croissance et la différenciation de ces cellules est importante non seulement pour la compréhension du développement neuronal normal, mais aussi pour la compréhension de l'étiologie des tumeurs du système nerveux central. Une meilleure distinction entre les gliomes de l'adulte et de l'enfant doit être mise de l'avant, en mettant l'accent sur l'amélioration de notre compréhension des transformations malignes, des similarités et des différences entre les tumeurs pédiatriques et adultes. De récentes études soutiennent que les anomalies/mutations génétiques observées chez l'adulte sont rarement observées chez l'enfant (Cheng et al., 2000; Merchant, Pollack et Loeffler 2010). Cliniquement, les gliomes pédiatriques se distinguent de l'adulte et ceci est reflété par une signature moléculaire différentielle (Eckert et al., 2007; Hambardzumyan et al., 2009). Ainsi, on peut consolider l'hypothèse que les LRPs sont des récepteurs potentiellement impliqués dans la progression de certaines CSC au cours du développement. On peut conclure que l'expression génique des LRPs dans les tumeurs malignes est dépendante de l'origine de la tumeur ainsi que de l'hétérogénéité de la production des LRPs dans celle-ci.

D'une manière générale, la reproduction d'un environnement inflammatoire par le TNF, carcinogénique par le PMA et hypoxique par le CoCl_2 ; conditions connues pour favoriser le processus tumoral et pour augmenter l'activité de la MMP-9, n'affecte guère l'expression des LRPs dans les CSC CD133⁺ des trois lignées cellulaires testées. À quelques exceptions, on remarque une hausse de l'expression de vLDL-R dans les CSC U87 CD133⁺ et de LRP-2 dans les CSC U251 CD133⁺ à la suite des divers traitements. Cependant, ces conditions pro-cancérigènes semblent moduler davantage l'expression de certains LRPs des cellules parentales et ce, dans les trois lignées cellulaires. Ainsi, on peut assumer que l'environnement

tumoral affecte l'expression des LRPs au sein des cellules formant la masse tumorale, mais ne semble pas moduler pour autant l'expression des LRPs au niveau des CSC CD133⁺.

Ces résultats soulignent la difficulté à déterminer les fonctions des LRPs dans le cancer. Cette étude n'est pas la seule à démontrer des données divergentes. Une équipe de chercheurs a démontré le rôle de LRP-1 dans le potentiel invasif du cancer du sein (Li et al., 1998), tandis qu'une autre équipe associe LRP-1 à un phénotype moins invasif et ce, dans le même type de cancer (Kancha, Stearns et Hussain, 1994). Clairement, la nature des ligands retrouvés dans le milieu extracellulaire déterminera les fonctions des LRPs et ce, probablement autant au niveau d'une cellule saine que cancéreuse. Au niveau des CSC, la nature des stimuli, soit le TNF, le PMA et le CoCl₂, ne semble pas modifier leur expression.

Partant de cette hypothèse, l'essai d'internalisation et de liaison aux protéines RAP et α_2 -macroglobuline devrait démontrer une hausse de l'activité de la liaison dans les cellules DAOY parentales suite aux divers traitements. Par contre, on observe une activité de liaison comparable entre les CSC CD133⁺ et les cellules parentales dans les différentes conditions testées. Le CoCl₂ module à la hausse le niveau de liaison à RAP et, le PMA et le CoCl₂ module également à la hausse le niveau de liaison de l' α_2 -macroglobuline à ces deux populations cellulaires. Par surcroît, on remarque même une augmentation plus importante de l'activité de liaison avec le CoCl₂ à RAP et avec le PMA à l' α_2 -macroglobuline dans les cellules CSC CD133⁺. Certes, le niveau d'expression d'une molécule donnée ne peut pas nécessairement être corrélé avec le niveau d'activité de cette molécule. Ces résultats suggèrent que les différents traitements peuvent autant moduler l'expression génique des LRPs dans les cellules de la masse tumorale, mais encore, affecter le niveau d'activité de liaison de ces récepteurs au sein des CSC CD133⁺.

4.2.2. Contribution de MT1-MMP dans la régulation de LRP1, de Cox-2 et d'I κ B

Plusieurs études ont démontré que les LRPs sont des cibles de MT1-MMP (Emonard et al., 2005; Barbolina et Stack, 2008). La dégradation de LRP par le complexe TIMP-2-MT1-MMP antagonise le processus d'internalisation des protéases matricielles dont la MMP-2 (Emonard et al., 2005). De ce fait, MT1-MMP contribue à maintenir un niveau élevé de protéinases solubles dans le milieu extracellulaire afin de favoriser la dégradation extensive

de la matrice par des cellules cancéreuses en migration. Outre MT1-MMP, trois autres membres de cette famille incluant MT2-MMP, MT3-MMP et MT4-MMP sont également capables de dégrader LRP *in vitro* (Rozanov et al., 2004). Nos données expérimentales démontrent une expression génique plus élevée de MT1-MMP et de MT3-MMP dans les cellules DAOY CD133⁺. La contribution de MT1-MMP a été analysée dans l'expression protéique de LRP-1 (LRP85) bien sur, mais aussi au niveau de l'expression protéique d'IκB et de Cox-2. Il a été démontré que Cox-2 est régulé à la hausse dans plusieurs cancers dont celui du colon, du sein, de la prostate, de la peau (Rüegg, Dormond et Mariotti, 2010) et dans la majorité des gliomes de grades élevés (Joki et al., 2000). Le facteur de transcription NF-κB est un coordonnateur clé dans l'inflammation, et le régulateur de son activation est la famille des protéines IκB (inhibiteur de kappa B) (Dolcet et al., 2005).

L'expression de base de LRP, augmentée de deux fois, suite à l'utilisation d'un ARN interférant dirigé contre les fonctions de MT1-MMP, supporte le lien entre eux dans les deux populations cellulaires. Par contre, l'expression de LRP1 suite aux trois traitements n'est pas modifiée de manière significative suite à l'utilisation du siMT1-MMP. Puisque les trois traitements stimulent l'expression de LRP1 dans les cellules Mock, on pensait observer une expression intensifiée de cette protéine lorsque les fonctions de MT1-MMP sont abolies. Il semble que MT1-MMP ne soit pas impliqué dans la signalisation induite par le TNF, le PMA et le CoCl₂ qui mène à l'expression protéique de LRP1. De plus, l'activité de la MMP-9 à la suite de l'utilisation du siMT1-MMP n'est pas affectée, ce qui démontre aussi une signalisation indépendante de MT1-MMP dans l'activité de la MMP-9. À l'opposé, l'activité de liaison de LRP est dépendante des fonctions de MT1-MMP. En effet, l'activité de liaison des cellules siMT1-MMP est complètement abolie et ce, dans les cellules DAOY parentales et les cellules CD133⁺ autant en présence de TNF, de PMA et de CoCl₂ que sans stimulation.

L'expression élevée de Cox-2 est aussi retrouvée parmi les conditions qui sont associées cliniquement à des gliomes agressifs (Shono et al., 2001). L'observation des résultats démontre que les fonctions de MT1-MMP sont impliquées dans la signalisation induite par le TNF, le PMA et le CoCl₂ menant à l'expression protéique de Cox-2 et ce, dans les deux populations cellulaires. D'ailleurs, on retrouve une diminution de l'expression de Cox-2 plus

importante dans les CSC CD133⁺ suite à l'abolissement des fonctions de MT1-MMP. Une étude de notre laboratoire a démontré que la signalisation menant à l'expression de Cox-2 dans les CSC CD133⁺ dérivé de glioblastome est dépendante de MT1-MMP (Annabi et al., 2009). On peut supposer retrouver la même collaboration dans les CSC CD133⁺ dérivées de médulloblastome, ce qui pourrait expliquer la modulation plus importante au sein des CSC CD133⁺ de notre étude actuelle. D'ailleurs, les auteurs ont également démontré la corrélation entre l'induction de Cox-2 et l'expression de CD133 suggérant que l'élaboration d'inhibiteurs spécifiques de Cox-2 peut être une perspective prometteuse dans le ciblage et le traitement des CSC. Par conséquent, le développement d'approches pharmaceutiques qui modifient l'expression de MT1-MMP ou l'axe de signalisation MT1-MMP/Cox-2 peut également être à considérer.

L'expression protéique d'IκB est inversement corrélée à l'expression protéique de Cox-2. NFκB inactif est lié à IκB; la phosphorylation d'IκB permet l'activation de NFκB qui pourra entamer la transcription de Cox-2. L'altération des fonctions de MT1-MMP augmente l'expression protéique d'IκB, mais la stimulation de cette protéine par le TNF, le PMA et le CoCl₂ devrait entraîner une hausse de l'expression d'IκB dans les cellules siMT1-MMP. Cependant, ce n'est pas ce que l'on observe : il n'y a pas de variation significative entre les cellules Mock et les cellules siMT1-MMP et ce, dans les deux populations cellulaires. On peut prétendre que MT1-MMP est impliqué à d'autres niveaux, autre que NFκB, dans la transcription de Cox-2, ce qui contribue à l'importance de MT1-MMP comme cible thérapeutique.

4.3. Utilisation de CD133 comme marqueur exclusif des CSC cérébrales

À la suite de la découverte de la sous-population cellulaire CD133⁺ dans les tumeurs cérébrales, qui partagent des propriétés des cellules souches neuronales, l'utilisation de CD133 comme marqueur des CSC a été amplement analysée dans divers cancers.

Cependant, les données expérimentales démontrent une perte de l'expression de CD133 à la surface cellulaire des DAOY CD133⁺ après les passages cellulaires en culture (Fig. 4.1A et B). Sachant que les CSC sont reconnues pour partager des propriétés des cellules souches

neuronales, plusieurs études ont démontré la quiescence des CSC CD133⁺ (Yang et Wechsler-Reya, 2007 ; Altaner, 2008). La prolifération lente qui en découle peut expliquer la perte de CD133 à la surface cellulaire au cours des passages cellulaires des cellules isolées CD133⁺. Cependant, l'essai de prolifération ne démontre pas une prolifération moindre dans les cellules CD133⁺ des trois lignées cellulaires testées (Fig. 4.2). On observe un taux de prolifération similaire entre la population cellulaire Parentale et CD133⁺ et ce, dans les trois lignées. D'ailleurs, les cellules CD133⁺ sont légèrement plus prolifératives que leur contrepartie parentales mais à un niveau non significatif. Cet essai de prolifération a été effectué lors de la troisième semaine suite au tri magnétique, suggérant que l'expression à la surface cellulaire de CD133 n'était pas élevée ce qui peut expliquer la prolifération comparable entre la population cellulaire Parentale et CD133⁺.

La popularité qui entoure le marqueur CD133 a entraîné plusieurs investigations sur les méthodes d'isolation et de purification des cellules cancéreuses CD133⁺. Récemment, une étude a été réalisée sur l'efficacité de l'isolation par tri magnétique. Cette analyse démontre un manque de spécificité causé par des liaisons non-spécifiques entre les cellules de gliomes et les microbilles quel que soit l'anticorps utilisé (Clément et al., 2009). De plus, l'épitope AC133, anticorps utilisé dans cette étude, est reconnu pour ces sites de glycosylation dont la nature moléculaire exacte et la localisation sur la protéine CD133 n'ont pas été déterminés. Vu la restriction de la liaison de l'anticorps à l'épitope glycosylé, l'expression de CD133 pourrait être sous-estimée si la protéine CD133 non-glycosylée est présente (Mizrak, Brittan et Alison, 2008). D'autre part, plusieurs études ont démontré que l'épitope AC133 peut être régulé à la baisse indépendamment de l'expression protéique de CD133 ou de son ARNm (Corbeil et al., 2000; Florek et al., 2005). Les difficultés rencontrées dans la détection et dans la purification des cellules CD133⁺ amène un questionnement à ce qui attrait à l'utilisation de CD133 comme marqueur exclusif de CSC cérébrales.

Des efforts sont faits afin de découvrir un marqueur plus spécifique des CSC qui pourrait distinguer les cellules souches normales des CSC et ainsi identifier une population cellulaire cible dans le traitement du cancer sans pourtant affecter les cellules souches neuronales saines. Le rôle fonctionnel du marqueur CD133 dans les cellules souches autant que dans les

CSC doit être établi. Par contre, il ne faut pas oublier que le glioblastome est une tumeur hétérogène donc, la possibilité d'y retrouver une gamme multiple de marqueurs est à considérer.

Actuellement, plusieurs analyses géniques ont été effectuées sur les CSC CD133⁺ afin d'identifier l'expression concomitante de biomarqueurs dans le but de mieux cibler la population des CSC (Liu et al., 2009; Bertolini et al., 2009; Sato et al., 2010). Par exemple, une étude a démontré que la sous-population cellulaire CD133⁺ exprime certains gènes impliqués dans la signalisation des cellules souches incluant la voie Sonic hedgehog (SHH) et Notch notamment. Une augmentation du niveau d'expression de gènes associés au maintien du potentiel souche, dont Oct4/3 et Nanog, ainsi qu'à l'adhésion, dont $\alpha 6$ -intégrine, et à la mobilité dont CXCR4 ont été observés dans la population cellulaire CD133⁺ du cancer du poumon (Bertolini et al., 2009). L'identification de CSC mais également de marqueurs associés à cette population cellulaire peut s'avérer utile pour l'optimisation d'approches thérapeutiques du cancer.

Tableau 4.1 : Expression à la hausse de gènes associés au potentiel «stemness» des CSC CD133⁺ du cancer du poumon (Bertolini et al., 2009).

Fonctions	Gènes
Migration	SHH, GLI1
Différenciation et prolifération	Notch1, Notch2, HES1
Mobilité	CXCR4
Maintient du potentiel souche	Nanog, Oct4/3
Adhésion	α 6-intégrine

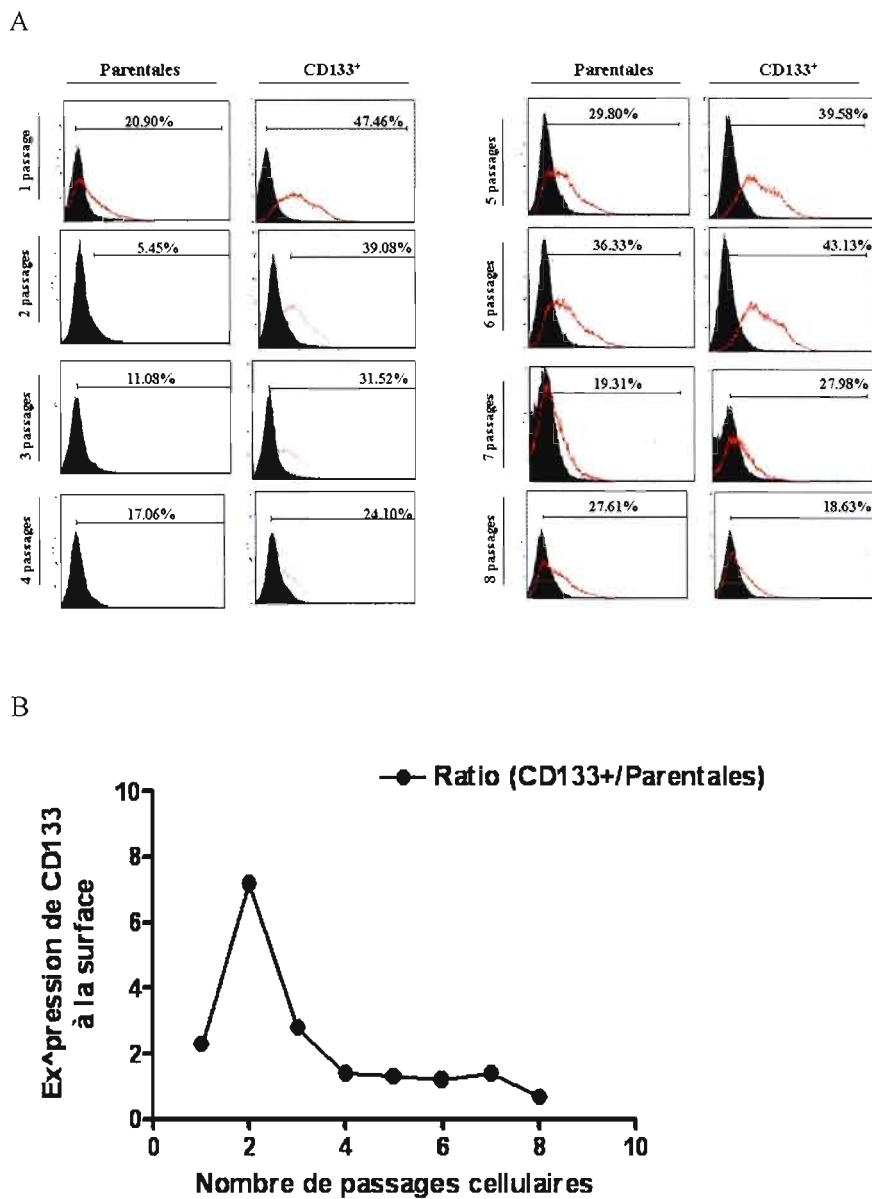


Figure 4.1: Expression de CD133 à la surface cellulaire des DAOY parentales et CD133⁺ selon le temps

A) Suite au tri magnétique, l'expression de CD133 à la surface cellulaire est analysée par cytométrie de flux à chaque semaine (à raison de 2 passages par semaine) dans les cellules DAOY parentales et CD133⁺. B) Quantification de l'enrichissement de l'expression de CD133 à la surface cellulaire exprimé en ratio (% d'expression CD133 des cellules CD133⁺ / % d'expression CD133 des cellules parentales).

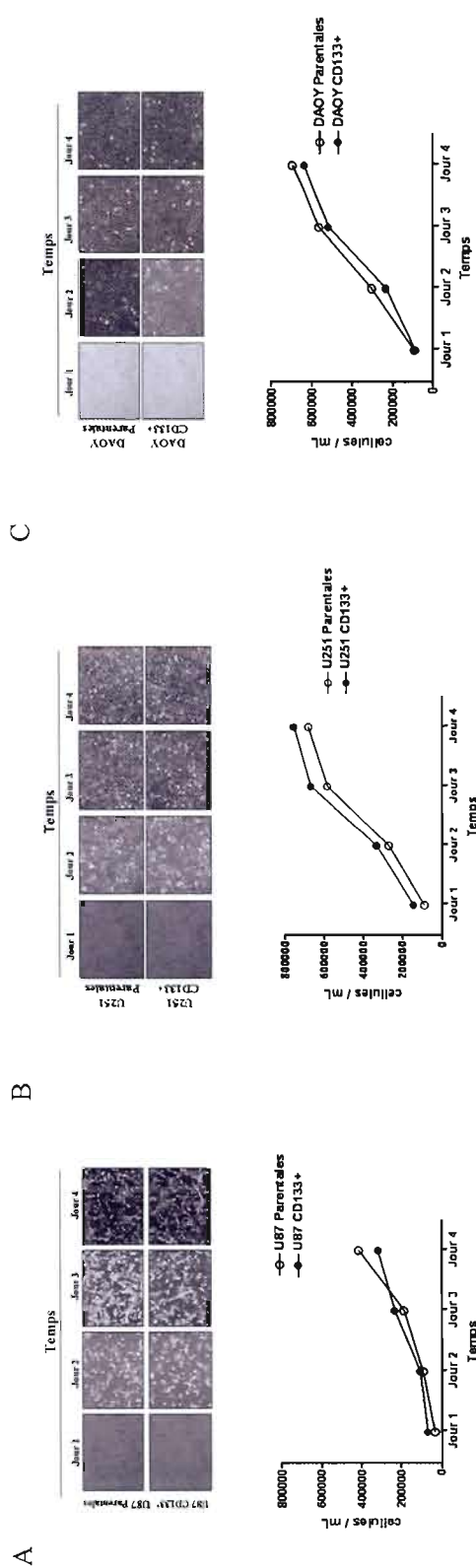


Figure 4.2: Essai de prolifération dans le temps des cellules CD133⁺ et parentales des trois lignées cellulaires
Trois semaines suite au tri magnétique, les cellules ont étéensemencées (10^4 cellules/puits) dans des plaques de 6 puits (9.8cm^2) afin d'être comptées à l'hémacytomètre durant 4 jours consécutifs. Des photographies représentatives de la confluence des cellules à chaque jour sont montrées. La quantification de la prolifération cellulaire est représentée sous forme graphique pour les cellules parentales (ronds blancs) et CD133⁺ (ronds noirs) des lignées A) U87, B) U251 et C) DAOY.

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'hypothèse du concept des CSC, autant dans l'initiation que dans la résistance et la récurrence des cancers, prend de plus en plus d'ampleur. Afin d'élaborer des traitements efficaces qui ciblent spécifiquement cette sous-population cellulaire, des recherches doivent être mises de l'avant pour mieux comprendre leur fonctionnement. Notre étude portant sur les CSC CD133⁺ dérivées de glioblastome et de médulloblastome a permis l'identification de partenaires moléculaires impliqués dans le phénotype d'invasion et d'inflammation de ces cellules. La signalisation, dépendante des fonctions de MT1-MMP, induite par le SIP prodigue deux cibles potentielles pour contrer les fonctions des CSC. L'utilisation de l'EGCg comme inhibiteur de cette signalisation peut être une voie à approfondir malgré la masse d'information contradictoire à son sujet. De plus, cette étude nous permet d'affirmer qu'une investigation plus spécifique de l'expression des LRPs au sein de chaque type de cancer doit être effectuée afin de discerner le rôle versatile de ces récepteurs. Dans cette voie, on peut mentionner que les LRPs sont exprimés à la hausse dans les CSC CD133⁺ de médulloblastome mais de futures analyses doivent être entamées afin d'identifier le lien, si lien il y a, entre leur expression génique à la hausse et leurs rôles dans la progression tumorale. Finalement, il n'est pas nouveau d'identifier Cox-2 comme cible thérapeutique dans le cancer, mais cette étude permet d'identifier Cox-2 mais également MT1-MMP comme cibles dans le phénotype inflammatoire des CSC CD133⁺.

Le but de cette étude n'est pas de confirmer CD133 comme marqueur des CSC, mais plutôt de caractériser la signalisation intracellulaire différentielle de lignées cellulaires exprimant ce marqueur à leurs surfaces. La controverse entourant CD133 ne date pas d'hier et ne se

résorbera pas demain, mais cette popularité qui entoure CD133 nous donne espoir qu'un jour, le rôle de CD133 sera clarifié dans le cancer.

Bibliographie

- Ahmed, S., Rahman, A., Hasnain, A., Lalonde, M., Goldberg, V.M., Haqqi, T.M. (2002). «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes». *Free Radic Biol Med* **33**(8): 1097-105.
- Albanell, J. and Adams, J. (2002). «Bortezomib, a proteasome inhibitor, in cancer therapy : from concept to clinic». *Drugs Fut* **27**(11): 1079.
- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. and McEwan, R. N.(1987). «A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells». *Cancer Res* **47**(12): 3239-45.
- Alfranca, A., López-Oliva, J.M., Genís, L., López-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., Quesada, A.J., Arroyo, A.G., Redondo, J.M. (2008). «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 s signaling pathway». *Blood* **112**(4): 1120-8.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. (2003). «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells». *Proc Natl Acad Sci* **100**(7):3983-8.
- Altaner, C. (2008). «Glioblastoma and stem cells». *Neoplasma* **55**(5):369-74.
- Anderson, D.J. (2004). «Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual». *Neuron* **30**(1): 19-35.
- Annabi, B., Laflamme, C., Sina, A., Lachambre, M.P., Béliveau, R. (2009). «A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells». *J Neuroinflammation* **6**:8.
- Arroyo, A.G., Genís, L., Gonzalo, P., Matías-Román, S., Pollán, A., Gálvez, B.G. (2007) «Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease». *Curr Pharm* **13**(17):1787-802.
- Baehring, J. M. (2005). «An update on oligodendroglial neoplasms». *Curr Opin Neurol* **18**: 639-44.
- Balkwill, F. (2009). «Tumour necrosis factor and cancer». *Nat Rev Cancer* **9**: 361–71.
- Barami, K. (2008). «Relationship of neural stem cells with their vascular niche: Implications in the malignant progression of gliomas». *J Clin Neuro* **15**: 1193-97.
- Bartolomé, R.A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sánchez-Mateos, P., Bustelo, X.R., Teixidó, J. (2006). «Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-

- type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion». *Cancer Res* **66**(1): 248-58.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. and Beier C. P. (2007). «CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles». *Cancer Res* **67**(9): 4010-5.
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J., Annabi, B. (2007). «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia* **9**(4):332-40.
- Berrier, A. L. and Yamada, K. M. (2007). «Cell-matrix adhesion». *J Cell Physiol* **213**(3): 565-73.
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., Roz, E., Caserini, R., Lo Vullo, S., Camerini, T., Mariani, L., Delia, D., Calabro, E., Pastorino, U. and Sozzi, G. (2009). «Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment». *Cell Biol* **106**(38): 16281-86.
- Bidlingmaier, S., Zhu, X. and Liu, B. (2008). «The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells». *J Mol Med* **86**(9): 1025-32.
- Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997). «Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell». *Nat Met* **3**: 730-7.
- Bonnet, D. (2005). «Cancer stem cells: lessons from leukemia». *Cell Prolif* **38**: 357-61.
- Bowie, A. and O'Neill, L. A. (2000). «Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries». *Biochem Pharmacol* **59**(1): 13-23.
- Buccoliero, A. M., Caldarella, A., Gheri, C. F., Taddei, A., Paglierani, M., Pepi, M., Mennonna, P. and Taddei, G. L. (2006). «Inducible cyclooxygenase (Cox-2) in glioblastoma – clinical and immunohistochemical (Cox-2-VEGF) correlations». *Clin Neuropathol* **25**: 59-66.
- Byrne, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. and Harmey J. H. (2005) «Angiogenic and cell survival fonctions of vascular endothelial growth factor (VEGF)». *J Cell Mol Med* **9**: 777-94.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R. F. and Hay, R. T. (1999). «Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha». *Oncogene* **18**: 3063–70.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T, Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. and Gilbertson, R. J. (2007). « A perivascular niche for brain tumor stem cells ». *Cancer Cell* **11**(1): 69-82.

- Cheng, Y., Pang, J.C., Ng, H.K., Ding, M., Zhang, S.F., Zheng, J., Liu, D.G., Poon, W.S. (2000). «Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas». *Histopathology* **37**(5): 437-44.
- Chintala, S. K., Tonn, J. C. and Rao, J. S., (1999). «Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas». *Int J Devl Neuroscience* **17**:495 -502
- Chung, J.H., Han, J.H., Hwang, E.J., Seo, J.Y., Cho, K.H., Kim, K.H., Youn, J.I., Eun, H.C. (2003) «Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes». *FASEB* **17**(13):1913-5.
- Chung, J.Y., Park, J.O., Phyu, H., Dong, Z., Yang, C.S. (2001). «Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate». *FASEB J* **15**(11): 2022-4.
- Claria, J. (2003). «Cyclooxygenase-2 biology». *Curr Pharm Des* **9**(27): 2177-90.
- Clarke, M. F. and Fuller, M. (2006). «Stem cells and cancer : two faces of eve». *Cell* **124**:
- Clément, V., Dutoit, V., Marino, D., Dietrich, P.Y., Radovanovic, I. (2009). «Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells». *Int J Cancer* **125**(1): 244-8.
- Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., Morgan, J.E. (2005). «Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche». *Cell* **122**(2): 289-301.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Mantovani, A. (2009). «Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability». *Carcinogenesis* **30**(7): 1073-81.
- Conover, J. C. and Notti, R. Q. (2007). «The neural stem cell niche». *Cell Tissue Res* **331**: 211-24.
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., Huttner, W.B. (2000). «The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions». *J Biol Chem* **275**(8): 5512-20
- Corbeil, D., Roper, K., Fargeas, C. A., Joester, A. and Huttner, W. B. (2001). «Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology». *Traffic* **2**: 82-91.
- Corda, S., Samuel, J .L. and Rappaport, L. (2000). «Extracellular matrix and growth factors during heart growth. Heart Fail». *Rev* **2**: 119-30.
- Currie, J. C., Fortier, S., Sina, A., Galipeau, J., Cao, J. and Annabi, B. (2007). «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem* **282**(11): 8142-9.

- Dell'Albani, P. (2008). «Stem cell markers in gliomas». *Neurochem Res* **33**: 2407-15.
- De Toni, F., Racaud-Sultan, C., Chicanne, G., Mas, V. M., Cariven, C., Mesange, F., Salles, J. P., Demur, C., Allouche, M., Payrastre, B., Manenti, S. and Ysebaert, L. (2006). «A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia». *Oncogene* **25**: 3113-22.
- Dewitt, D. L. (1991). «Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression». *Biochim. Biophys. Acta* **1083**: 121.
- Dick, J. E. and Lapidot, T. (2005). «Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells». *Int. J. Hematol* **82**: 389-96.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. and Matias-Guiu, X. (2005). «NF- κ B in development and progression of human cancer». *Virchows Arch* **446**: 475-82.
- Eckert, J.J., Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Balen, A.H., Leese, H.J., Picton, H.M., Cameron, I.T., Fleming, T.P. (2007). «Human embryos developing in vitro are susceptible to impaired epithelial junction biogenesis correlating with abnormal metabolic activity». *Hum Reprod* **22**(8): 2214-24.
- Emonard, H., Bellon, G., Diesbach, P., Mettlen, M., Hornebeck, W. and Courtoy, P.J. (2005). «Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend"». *Biochimie* **87**: 369-76.
- English D., Brindley D. N., Spiegel, S. and Garcia J. G. (2002). «Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate». *Biochim Biophys Acta* **1582**: 228-39.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., De Maria, R. (2008). «Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population». *Cell Death Differ* **15**(3): 504-14.
- Esposito, I., Kleeff, J., Bischoff, S.C., Fischer, L., Collecchi, P., Iorio, M., Bevilacqua, G., Büchler, M.W., Friess, H. (2002). «The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer». *Lab Invest* **82**(11): 1481-92.
- Fassina, G., Venè, R., Morini, M., Minghelli, S., Benelli, R., Noonan, D.M., Albini, A. (2004) «Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate». *Clin Cancer Res* **10**(14): 4865-73.
- Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuso, S., Scambia, G. (2008). «Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer». *Int J Gynecol Cancer* **18**(3): 506-14.
- Florek, M., Haase, M., Marzesco, A.M., Freund, D., Ehninger, G., Huttner, W.B., Corbeil, D. (2005). «Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in

- adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer». *Cell Tissue Res* **319**(1):15-26.
- Folkman J., Merler E., Abernathy C. and Williams G. (1971) «Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis». *J Exp Med* **133**: 275-88.
- Fortier, S., Labelle, D., Sina, A., Moreau, R., Annabi, B. (2008). «Silencing of the MT1-MMP/G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Lett* **582**(5):799-804.
- Garbisa, S., Sartor, L., Biggin, S., Salvato, B., Benelli, R., Albini, A. (2001) «Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate». *Cancer* **91**(4): 822-32.
- Geiger, T. R. and Peeper, D. S. (2009) «Metastasis mechanisms». *Biochim Biophys Acta* **1796**(2): 293-308.
- Gimbrone, M. A., Leapman, S. B., Cotran, R. S. and Folkman, J. (1972) «Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization». *J Exp Med* **136**: 261-76.
- Gouni-Berthold, I., Sachinidis, A. (2004) «Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases». *Curr Pharm Des* **10**(11): 1261-71.
- Hagg, T. (2005). «Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view». *Trends Neurosc* **28**(11): 589-95.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., Rosenblum, M.K., Pandolfi, P.P., Manova-Todorova, K., Holland, E.C. (2008). «PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo». *Genes Dev* **22**(4): 436-48.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). «The hallmarks of cancer». *Cell* **100**: 57-70.
- Harris, C. C. (1996). «p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology». *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**(2): 115-18.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., Heeschen, C. (2007). «Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer». *Cell Stem Cell* **1**(3):313-23.
- Hotary, K. B., Allen, E. D., Brooks, P. C., Datta, N. S., Long, M. W. and Weiss, S. J. (2003). «Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix». *Cell* **114**: 33-45.
- Huang, W. C., Chen, J. J., Inoue, H. and Chen, C. C. (2003). «Tyrosine phosphorylation of I- κ B kinase α/β by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression». *J Immuno* **170**: 4767-75.

- Joki, T., Heese, O., NiKas, D. C., Bello, L., Zhang, J., Kraeft, S. K., Seyfried, N. T., Abe, T., Chen, L. B., Carroll, R. S. and Black, P. (2000). «Expression of cyclooxygenase 2 (Cox-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific Cox-2 inhibitor, NS-398». *Cancer Res* **60**: 4926-31.
- Jung, Y.D., Ellis, L.M. (2001) «Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea». *Int J Exp Pathol* **82**(6): 309-16.
- Kancha, R.K., Stearns, M.E., Hussain, M.M. (1994). «Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells». *Oncol Res* **6**(8): 365-72.
- Kania, G., Corbeil, D., Fuchs, J., Tarasov, K. V., Blyszczuk, P., Huttner, W. B., Boheler, K. R. and Wobus, A. M. (2005). «Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors». *Stem Cells* **23**(6): 791-804.
- Kemper, K., Sprick, M. R., De Bree, M. and Scopelliti, A. (2010). «The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation». *Cancer Res* **70**(2): 719-29.
- Khan, N. and Mukhtar, H. (2008). «Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols». *Cancer Letters* **269**: 269-80.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., Mukhtar, H. (2006). «Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Res* **66**(5): 2500-5.
- Kim, H.S., Kim, M.H., Jeong, M., Hwang, Y.S., Lim, S.H., Shin, B.A., Ahn, B.W., Jung, Y.D. (2004). «EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells». *Anticancer Res.* **24**(2B): 747-53.
- Kleiner, D. E. and Stetler-Stevenson, W.G. (1999). «Matrix metalloproteinases and metastasis». *Cancer Chemother Pharmacol* **43** Suppl: S42-51.
- Kundu, J.K., Na, H.K., Chun, K.S., Kim, Y.K., Lee, S.J., Lee, S.S., Lee, O.S., Sim, Y.C., Surh, Y.J. (2003). «Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells». *J Nutr* **133**(11 Suppl 1): 3805S-3810S.
- Laemmli, U. K. (1970). «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lakka S. S., Gondi C. S. and Rao J. S. (2005) «Proteases and glioma angiogenesis». *Brain Pathol* **15**: 327-41.
- Lamy, S., Gingras, D., Béliveau, R. (2002) «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res* **62**(2): 381-5.

- Langlois, B., Emonard, H., Martiny, L. and Dedieu, S. (2009). «Implications multiples du récepteur LRP-1 dans la progression tumorale». *Pathologie Biologie* **57**: 548-54.
- Li, Y., Wood, N., Grimsley, P., Yellowlees, D., Donnelly, P.K. (1998). «In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein». *Invasion Metastasis* **18**(5-6): 240-51.
- Lillis, A. P., Mikhailenko, I. and Strickland, D. K. (2005). «Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability». *J Thromb Haemost* **3**: 1884-93.
- Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. and Strickland, D. K. (2008). «LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies». *Physiol Rev* **88**: 887-918.
- Liu, S. L., Lin, X., Shi, D. Y., Cheng, J., Wu, C. Q. and Zhang, Y. D. (2002). «Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signalling pathways». *Arch Biochem Biophys* **406**(2): 173-82.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L. and Yu, J. S. (2006). «Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma». *Mol Cancer* **5**: 67.
- Liu, Q., Nguyen, D. H., Dong, Q., Shitaku, P., Chung, K., Liu, O. Y., Tso, J. L., Liu, J. Y., Konkankit, V., Cloughesy, T. F., Mischel, P. S., Lane, T. F., Liao, L. M., Nelson, S. F. and Tso, C. L. (2009). «Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors». *J Neurooncol* **94**: 1-19.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C. and Jouvett, A. (2007). «The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system». *Acta Neuropathol* **114**: 97-109.
- Madri, J. A. (2009). «Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury». *J Physiol Pharmacol* **4**: 95-104.
- Maeda-Yamamoto, M., Suzuki, N., Sawai, Y., Miyase, T., Sano, M., Hashimoto-Ohta, A., Isemura, M. (2003). «Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells». *J Agric Food Chem* **51**(7): 1858-63.
- McKinney, P. A. (2005). «Central nervous system tumours in children: epidemiology and risk factors». *Bioelectromagnetics* **7** Suppl: S60-8.
- Merchant, T.E., Pollack, I.F., Loeffler, J.S. (2010). «Brain tumors across the age spectrum: biology, therapy, and late effects». *Semin Radiat Oncol* **20**(1):58-66.
- Milkiewicz M., Ispanovic E., Doyle J. L. and Haas T. L. (2006) «Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation». *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 333-357.

- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K. and Buck, D. W. (1997). «A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning». *Blood* **90**: 5013-21.
- Mizrak D., Brittan, M., Alison, M.R. (2008). «CD133: molecule of the moment». *J Pathol* **214**(1):3-9.
- Murph, M., Tanaka, T., Liu, S., Mills, G.B.(2006). «Of spiders and crabs: the emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer». *Clin Cancer Res.* **12**(22): 6598-602.
- Nagase, H. and Woessner, J.F. (1999). «Matrix metalloproteinases». *J Biol Chem* **274**: 21491-94.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., Ries, C. (2006). «Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells». *Stem Cells* **24**(8): 1892-903.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E. (2007). «A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice». *Nature* **445**(7123): 106-10.
- Onguru, O., Gamsizkan, M., Ulutin, C. and Gunhan, O. (2008). «Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression and angiogenesis in glioblastoma». *Neuropathol* **28**: 29-34.
- Oshima, K., Tju Wei Teo, D., Senn, P., Starlinger, V. and Heller, S. (2007). «Lif promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells». *BMC Developmental Biology* **7**: 1-11.
- Panetti, T. S., Nowlen, J. and Mosher, D. F. (2000). «Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(4): 1013-9.
- Panetti, T. S. (2002). «Differential effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells». *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 190-6.
- Park, J.W., Choi, Y.J., Suh, S.I., Kwon, T.K. (2001). «Involvement of ERK and protein tyrosine phosphatase signaling pathways in EGCG-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw 264.7 cells». *Biochem Biophys Res Commun* **286**(4): 721-5.
- Passegué, E., Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E. and Weissman, I. L. (2003). «Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics»? *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11842-49.
- Pébay, A., Bonder, C.S., Pitson, S.M. (2007) «Stem cell regulation by lysophospholipids». *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **84**: 83-97.
- Pfenninger, C. V., Roschupkina, T., Hertwig, F., Kottwitz, D., Englund, E., Bengzon, J., Jacobsen, S. E. and Nuber, U. A. (2007). «CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult

subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells». *Cancer Res* **67**(12): 5727-36.

Piperi C., Themistocleous M. S., Papavassiliou, G. A., Farmaki, E., Levidou, G., Korkolopoulou, P., Adamopoulos, C. and Papavassiliou, A. G. (2010). «High incidence of MGMT and RARbeta promoter methylation in primary glioblastomas: association with histopathological characteristics, inflammatory mediators and clinical outcome». *Mol Med* **16**(1-2): 1-9.

Presta, M., Dell'Era, P., Mitola S., Moroni E., Ronca R. and Rusnati M. (2005) «Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis». *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 159-78.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). «Stem cells, cancer, and cancer stem cells». *Nature* **414**: 105-11.

Rich, J. N. and Eyler, C. E. (2008). «Cancer stem cells in brain tumor biology». *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 411-20.

Rossi, A., Caracciolo, V., Russo, G., Reiss, K., Giordano, A. (2008). «Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy». *Clin Cancer Res* **14**(4):971-6.

Rozañov, D. V., Hahn-Dantona, E., Strickland, D. K. and Strongin, A. Y. (2004). «The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells». *J Biol Chem* **279**(6): 4260-68.

Rüegg, C., Dormond, O. and Mariotti, A. (2010). «Endothelial cell integrins and COX-2 : mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis». *Biochim Biophys Acta* **1654**(1): 51-67.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994). «A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells». *Nature* **370**: 61-65.

Sato, H., Okada, Y., Seiki, M. (1997). «Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion». *Thromb Haemost.* **78**(1): 497-500.

Sato, A., Sakurada, K., Kumabe, T., Sasajima, T., Beppu, T., Asano, K., Ohkuma, H., Ogawa, A., Mizoi, K., Tominaga, T., Kitanaka, C. and Kayama, T. (2010). «Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas». *Neurosurg Rev* **33**(2): 175-83.

Schetter, A. J., Heegaard, N. H. H. and Harris, C. C. (2010). «Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways». *Carcinogenesis* **31**(1): 37-49.

- Seiki, M. (2003). «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion». *Cancer Lett* **194**(1): 1-11.
- Sethi, G., Sung, B. and Aggarwal, B. B. (2008). «TNF: a master switch for inflammation to cancer». *Front Biosci* **13**: 5094–5107.
- Shmelkov, S. V., Jun, L., St-Clair, R., McGarrigle, D., Derderian, C. A., Usenko, J. K., Costa, C., Zhang, F., Guo, X. and Rafii, S. (2004). «Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133». *Blood* **103**(6): 2055-61.
- Shono, T., Tofilon, P. J., Bruner, J. M., Owolabi, O. and Lang, F. F. (2001). «Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations». *Cancer Res* **61**: 4375-81.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P. B. (2003). «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors». *Cancer Res.* **63**: 5821-28.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. and Dirks, P. B. (2004). «Identification of human brain tumour initiating cells». *Nature* **432**: 396-401.
- Smith, W. L. and DeWitt, D. L. (1995). «Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs». *Semin. Nephrol* **15**: 179.
- Smith, W. L., Gararto, E. M. and Dewitt, R. L. (1996). «Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenase)-1 and -2». *J Biol Chem* **271**: 33157.
- Soltysova, A., Altanerova, V. and Altaner, C. (2005). «Cancer stem cells». *Neoplasma* **52**(6): 435-40.
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H. E. (1990). «Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation». *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(1): 364-8.
- Strobel, P., Allard, C., Perez-Acle, T., Calderon, R., Aldunate, R. and Leighton, F. (2005). «Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes». *Biochem J* **386**(Pt 3): 471-8.
- Teodorczyk, M. and Martin-Villalba, A. (2010). «Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma». *J Cell Physiol* **222**(1): 1-10.
- Thun, M. J., Henley, S. J. and Patrono, C. (2002). «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues». *J Natl Cancer Inst* **94**: 252-66.

- Ueda, J., Kajita, M., Suenaga, N., Fujii, K., Seiki, M. (2003). «Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors». *Oncogene* **22**(54): 8716-22.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A. and Opdenakker, G. (2002). «Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)». *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**(6): 375-536.
- Wang, D. and Dubois, R. N. (2008). «Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer». *Cancer lett* **267**(2): 197-203.
- Ward, N. L. and Lamanna, J. C. (2004). «The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems». *Neurol Res* **26**: 870-83.
- Weigelt, B., Peterse, J. L. and Veer L. J. (2005). «Breast cancer metastasis: markers and models». *Nat Rev Cancer* **5**: 591-602.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. and Huttner, W. B. (1997). «Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells». *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(23): 12425-30.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., Wick, W. (2001) «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res* **61**(6):2744-50.
- Wu, K.K. (1998). «Injury-coupled induction of endothelial eNOS and COX-2 genes: a paradigm for thromboresistant gene therapy». *Proc Assoc Am Physicians* **110**(3):163-70.
- Wu, Y. and Zhou, B. P. (2010). «TNF- α /NF κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion». *Cancer Res* **102**(4): 639-44.
- Yang, C.S., Lambert, J.D., Hou, Z., Ju, J., Lu, G., Hao, X. (2006). «Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols». *Mol Carcinog* **45**(6): 431-5.
- Yang, Z. J. and Wechsler-Reya, R. J. (2007). «Hit'em where they live: targeting the cancer stem cell niche». *Cancer Cell* **11**: 3-5.
- Yu, S. C. and Bian, X. W. (2009). «Enrichment of cancer stem cells based on heterogeneity of invasiveness». *Stem Cell Rev and Rep* **5**: 66-71.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. and Herold-Mende, C. C. (2008). «Stem cell Marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients». *Clin Cancer Res*, **14**(1): 123-129.